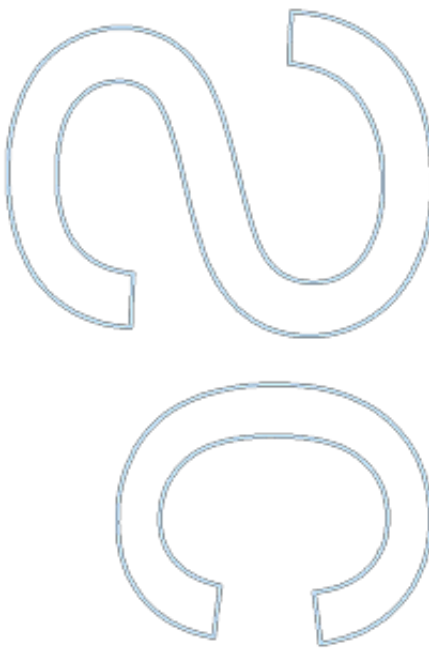
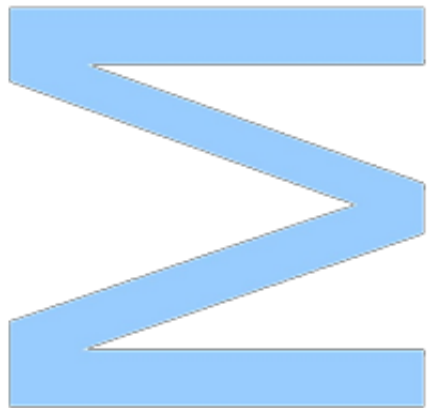


Otimização de métodos de extração para a análise de antibióticos em farinhas de aves e mamíferos

Cristiana Isabel Coelho da Silva
Dissertação de Mestrado apresentada à
Faculdade de Ciências da Universidade do Porto em
Química
2016

Otimização de métodos de extração para a análise
de antibióticos em farinhas de aves e mamíferos.

Cristiana Isabel Coelho da Silva



Otimização de métodos de extração para a análise de antibióticos em farinhas de aves e mamíferos

Cristiana Isabel Coelho da Silva

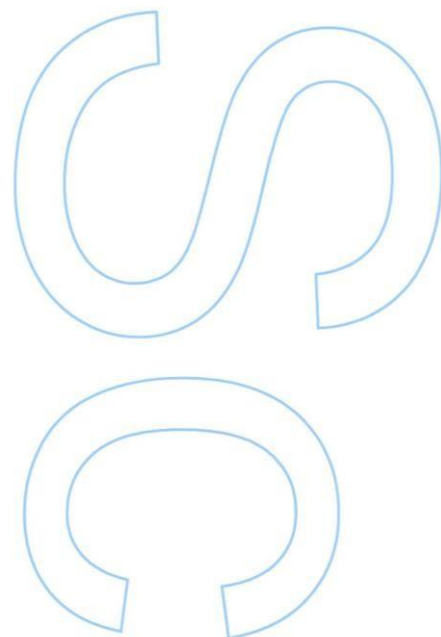
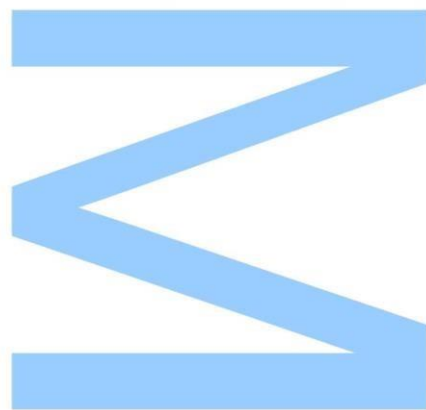
Mestrado em Química
Departamento de
Química e Bioquímica
2016

Orientador

Maria Clara Basto, Professor Auxiliar, FCUP

Coorientador

Marisa Almeida, Investigador Auxiliar, CIIMAR

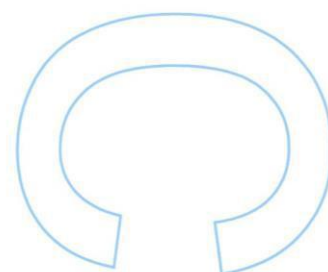
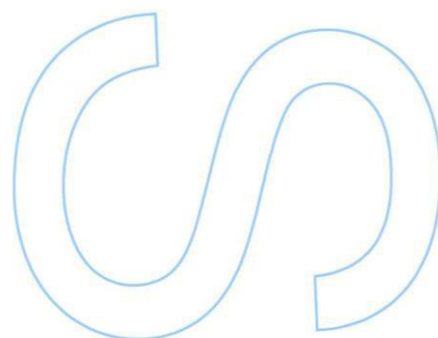
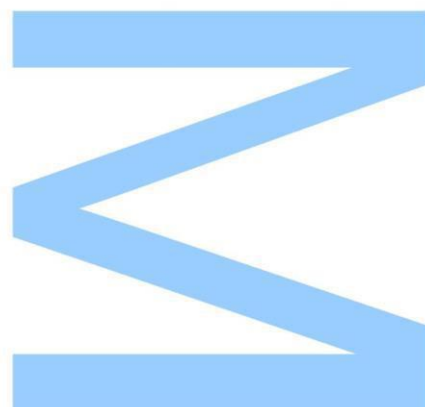




Todas as correções determinadas
pelo júri, e só essas, foram efetuadas.

O Presidente do Júri,

Porto, ____/____/____



Agradecimentos

A realização desta dissertação não é obra de uma só pessoa, contou com o apoio e incentivo de muitas pessoas sem as quais o caminho para término deste trabalho seria uma realidade mais difícil, a essas pessoas desejo expressar o meu sincero agradecimento.

À Professora Doutora Maria Clara Basto, pela sua orientação, por quem tive o privilégio de ser apoiada, pela total disponibilidade e colaboração no solucionar de dúvidas e problemas que surgiram ao longo desta dissertação. Expresso o meu agradecimento pela sabedoria, opiniões, críticas e sugestões que contribuíram para o resultado final desta dissertação.

À Doutora Marisa Almeida, o meu agradecimento pela receptividade, carinho e paciência, acima de tudo.

À Doutora Mafalda Baptista, pelo seu apoio, incentivo e paciência demonstrada e ajuda na superação dos obstáculos que ao longo desta caminhada foram surgindo.

Agradece-se o financiamento desta pesquisa através do projeto IJUP EMPRESAS (PP-IJUP2014-SOJA DE PORTUGAL-15) e do Fundo Estratégico UID/Multi/04423/2013 através de fundos nacionais provenientes da Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT).

A Doutora Elisabete Matos, pela promoção de uma cultura dinâmica e renovadora, promovendo uma adequada gestão de conhecimento e o estímulo da criatividade interna.

Ao Departamento de Química e Bioquímica da Faculdade de Ciências da Universidade do Porto pelas instalações cedidas.

Aos meus amigos e colegas, Alfredo Esteves e Telmo Francisco, por estarem ao meu lado durante esta fase, pelo seu companheirismo, força e apoio.

Por último, um especial agradecimento aos meus pais que durante a vida foram modelos de dignidade, humildade e trabalho, pelo esforço demonstrado ao longo da minha caminhada estudantil para que eu viesse a ter um futuro melhor e realizasse os meus sonhos e aos meus irmãos pela diversão e maluquices que alegraram os meus dias.

Resumo

Este trabalho teve como objetivo a otimização de métodos de extração, limpeza e pré-concentração para detetar e quantificar antibióticos utilizados em explorações agropecuárias, nomeadamente norfloxacin, ciprofloxacina, enrofloxacin, minociclina, oxitetraclina e tetraciclina, em produtos finais dessas explorações, como é o caso das farinhas de mamíferos, penas e aves, utilizadas em rações e compostas por restos de animais que não são comercializados ao público.

Para tal otimizou-se as condições das técnicas de extração assistida por micro-ondas (MAE), de extração por fase sólida (SPE) e secagem dos extratos, e de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).

As condições de determinação foram primeiramente otimizadas utilizando soluções padrões dos antibióticos, sem matriz de farinha. Posteriormente todos os testes foram efetuados em matriz de farinha. Para estes testes as farinhas de mamíferos, penas e aves foram dopadas com os três antibióticos norfloxacin, ciprofloxacina e enrofloxacin com uma concentração de 0,5 mg L⁻¹, ou com os três antibióticos minociclina, oxitetraclina e tetraciclina com uma concentração de 1,0 mg L⁻¹.

A MAE dos antibióticos da matriz de farinha foi efetuada durante 15 minutos, a 30°C, tendo, como solvente, uma solução de metanol/ácido fórmico 95/5 (v/v). Posteriormente, na técnica de SPE foram utilizados cartuchos HLB eluídos com uma solução de metanol/ácido fórmico 95/5 (v/v). Finalmente, antes da injeção no HPLC, as amostras são secas com fluxo baixo de nitrogénio, devido à necessidade de troca de solvente.

Para os antibióticos norfloxacin, ciprofloxacina e enrofloxacin, verificou-se que o método global permitia quantificar antibióticos nas farinhas para concentrações acima dos 5 µg g⁻¹, embora as taxas de recuperação sejam abaixo do esperado (<100%).

As taxas de recuperação dos antibióticos norfloxacin, ciprofloxacina e enrofloxacin, foram, na farinha de mamíferos de 83±6%, 61±3% e 86±3%, para a farinha de aves foram de 66±10%, 68±12% e 76±7%, e para a farinha de penas foram de 64±4%, 73±4% e 89±4%, respetivamente.

Para os antibióticos minociclina, oxitetraciclina e tetraciclina, realizada a dopagem da farinha antes da MAE, observou-se o desaparecimento da minociclina e a impossibilidade de quantificação dos restantes compostos (oxitetraciclina e tetraciclina) por falta de resolução nos cromatogramas.

Quando a dopagem foi efetuada após MAE, o pico da minociclina tornava-se quantificável, com uma percentagem de recuperação de massa de $86\pm 26\%$, para a farinha de mamíferos, $84\pm 3\%$, para a farinha de aves e de $89\pm 4\%$, para a farinha de penas. Para os restantes compostos (oxitetraciclina e tetraciclina) continuou a observar-se falta de resolução dos picos nos cromatogramas, verificando-se ser necessário efetuar melhorias no procedimento para a determinação simultânea destes antibióticos na matriz da farinha.

Palavras-chave:

Antibióticos, extração assistida por microondas, matriz de farinha.

Abstract

This study aimed to optimize extraction, cleaning and pre-concentration methods to detect and quantify antibiotics used in agricultural farms, in particular norfloxacin, ciprofloxacin, enrofloxacin, minocycline, oxytetracycline and tetracycline, in the final products of these farms, such is the case of mammalian, feathers and birds meals used in feeding and that are composed of animal remains that are not marketed to the public.

For that, the conditions for extraction assisted by microwave (MAE), solid phase extraction (SPE), drying of the extracts and high-performance liquid chromatography (HPLC) analysis were optimized.

Firstly, conditions were optimized using standard solutions of antibiotics without meal matrix. Subsequently all tests were performed in meal matrix. For these tests mammalian, feathers and birds meals were spiked with three antibiotics norfloxacin, enrofloxacin and ciprofloxacin at a concentration of 0.5 mg L^{-1} , or with the three antibiotic minocycline, oxytetracycline and tetracycline at a concentration of $1,0 \text{ mg L}^{-1}$.

The MAE of the meals was performed for 15 minutes at 30°C , with a solution of methanol / formic acid 95/5 (v/v). Subsequently, for SPE, HLB cartridges were used, the elution being carried out with a methanol / formic acid 95/5 (v/v) solution. Lastly, before HPLC analysis, the extracts were dried with a low nitrogen flow, due to the need of solvent exchange.

For the antibiotics norfloxacin, enrofloxacin and ciprofloxacin, it was found that the overall method allowed the quantification of the antibiotics in the meals matrix for concentrations above 5 ug g^{-1} , but recovery rates were lower than expected ($<100\%$).

The recovery rates for the antibiotics norfloxacin, ciprofloxacin and enrofloxacin were, for the mammals' meal $83\pm6\%$, $61\pm3\%$ and $86\pm3\%$, for the birds' meal $66\pm10\%$, $68\pm12\%$ and $76\pm7\%$, and for the feathers' meal $64\pm4\%$, $73\pm4\%$ e $89\pm4\%$, respectively.

For the antibiotics minocycline, oxytetracycline and tetracycline, when spiking the meals before MAE, it was observed the disappearance of minocycline and the

impossibility of quantifying the remaining compounds (oxytetracycline and tetracycline) for lack of resolution in the chromatograms.

When meals spiking was performed after MAE, the peak of minocycline became measurable, with a percentage of mass recovery of $86\pm 26\%$ for mammals meal, $84\pm 3\%$ for the poultry meal and $89\pm 4\%$ for the feather meal. For the remaining compounds (oxytetracycline and tetracycline) there was still a lack of peak resolution in the chromatograms. These results indicate that it is still necessary to make improvements in the procedure for the simultaneous determination of these antibiotics in meal matrix.

Key-words:

Antibiotics, microwave-assisted extraction, meals matrix.

Índice

Agradecimentos.....	V
Resumo	VI
Abstract	VIII
Índice.....	X
Lista de tabelas.....	XII
Lista de figuras	XIII
Lista de abreviaturas.....	XVII
1. Introdução.....	1
1.1. Produção e utilização de antibióticos	1
1.2. Resíduos de antibióticos no ambiente	3
1.3. Limites máximos de resíduos (LMR) para medicamentos veterinários na EU	4
1.4. Antibióticos utilizados na exploração pecuária	7
1.4.1. Fluoroquinolonas.....	7
1.4.2. Tetraciclina.....	8
1.5. Detecção e quantificação de antibióticos veterinários em produtos de origem animal.....	10
1.5.1. Complexidade de matriz.....	10
1.5.2. Métodos de extração dos antibióticos veterinários em matrizes biológicas complexas	11
1.5.3 Métodos de quantificação dos antibióticos veterinários em matrizes biológicas complexas	12
1.6. Objetivo.....	13
2. Material e Métodos	14
2.1. Material e reagentes.....	14
2.2. Amostras de farinha	14
2.3. Soluções padrão de antibióticos.....	14

2.3.1. Secagem.....	15
2.3.2. Extração em fase sólida (SPE).....	15
3.3.3. Filtração	16
2.4. Amostras de farinha	16
2.4.1. Extração assistida por microondas.....	16
2.4.2. SPE.....	17
2.5. Cromatografia líquida de fase reversa com detetor DAD.....	18
2.6. Análise estatística	19
3. Resultados e Discussão	20
3.1. Soluções padrão de antibióticos.....	20
3.2. Recuperação de antibióticos de soluções padrão	23
3.2.1. Secagem.....	23
3.2.2. Filtração	24
3.2.3. SPE.....	27
3.3. Recuperação de antibióticos de amostras de farinha	29
3.3.1. Otimização da extração assistida por microondas (MAE).....	29
3.3.2. Otimização do processo de SPE	34
3.3.3 Otimização do processo global de recuperação de antibióticos das farinhas ...	36
3.3.3.1. Fluoroquinolonas	36
3.3.3.2. Tetraciclinas.....	44
4. Conclusão.....	54
Referências Bibliográficas	56

Lista de tabelas

Tabela 1 – Limites máximos de resíduos em tecidos alvo dos antibióticos enrofloxacina, oxitetraciclina e tetraciclina legislados no Regulamento No. (CEE) 2377/90. [27].....	6
Tabela 2 - Parâmetros das retas de regressão linear e limites de deteção (LOD) e de quantificação (LOQ) para os antibióticos norfloxacina, ciprofloxacina, enrofloxacina e minociclina, oxitetraciclina, tetraciclina. R^2 sendo o coeficiente de correlação.	22
Tabela 3 - Parâmetros das retas de regressão linear e limites de deteção (LOD) e de quantificação (LOQ) (gama mais baixa de concentrações) para os antibióticos norfloxacina, ciprofloxacina e enrofloxacina, na matriz de farinha de mamíferos.	39
Tabela 4 - Parâmetros das retas de regressão linear e limites de deteção (LOD) e de quantificação (LOQ) (gama mais baixa de concentrações) para os antibióticos norfloxacina, ciprofloxacina e enrofloxacina, na matriz farinha de aves.....	41
Tabela 5 - Parâmetros das retas de regressão linear e limites de deteção (LOD) e de quantificação (LOQ) (gama mais baixa de concentrações) para os antibióticos norfloxacina, ciprofloxacina e enrofloxacina, na matriz de farinha de penas	42

Lista de figuras

Figura 1 - Estrutura química da norfloxacin (A) [31], ciprofloxacina (B) [32] e enrofloxacin (C) .	8
Figura 2 - Estrutura química da minociclina (A) [40], oxitetraciclina (B) [41] e tetraciclina (C) [42].	9
Figura 3 – 1 - Cromatograma típico de uma solução padrão mistura de concentração 1 mg L ⁻¹ de norfloxacin (A), ciprofloxacina (B) e enrofloxacin (C). Tempo de retenção de A: 10,4 min; Tempo de retenção de B: 10,6 min; Tempo de retenção de C: 11,2 min; 2 - Cromatograma típico de uma solução padrão mistura de concentração 3 mg L ⁻¹ de minociclina (A), oxitetraciclina (B) e tetraciclina (C). Tempo de retenção de A: 8,4 min; Tempo de retenção de B: 10,1 min; Tempo de retenção de C: 10,7 min.	21
Figura 4 - Taxas de recuperação (%) dos antibióticos de soluções padrões submetidas ao processo de secagem sob baixo fluxo de nitrogénio. (A) Padrão com massa de 2,5 µg de norfloxacin, ciprofloxacina e enrofloxacin (n=5). (B) Padrão com massa de 0,5 µg de minociclina, oxitetraciclina e tetraciclina (n=3).	24
Figura 5 - Taxas de recuperação (%) dos antibióticos em padrões filtrados por filtros de fibra de vidro (cinza claro), celulose (cinza escuro) e polipropileno (preto) com diferentes massas de antibiótico (0,1; 0,2; 0,4; 0,6; 1,0 µg); (n = 1). (A) norfloxacin, (B) ciprofloxacina e (C) enrofloxacin.	25
Figura 6 - Taxas de recuperação (%) dos antibióticos em padrões filtrados por filtros de fibra de vidro com diferentes massas de antibiótico (0,1; 0,2; 0,4; 0,6 µg); (n = 1) oxitetraciclina (cinza escuro) e tetraciclina (cinza claro).	26
Figura 7 - Taxas de recuperação (%) dos antibióticos em padrões que foram submetidas ao processo de SPE A - norfloxacin (cinza claro), ciprofloxacina (cinza escuro) e enrofloxacin (preto) (n=1). B - minociclina (cinza claro), oxitetraciclina (cinza escuro) e tetraciclina (preto) (n=1).	28
Figura 8 - Taxas de recuperação (%) dos antibióticos em amostras de farinha submetidas ao processo de extração assistida por microondas, usando metanol com 5% de ácido fórmico, e dopadas com uma massa de antibiótico norfloxacin, ciprofloxacina e enrofloxacin de 1,0 µg e seguidamente aos processos de SPE e secagem sob baixo fluxo de nitrogénio. (A) farinha de mamíferos (n=5), (B) farinha de penas (n=3) e (C) farinha de aves (n=3).	30
Figura 9 - Taxas de recuperação (%) dos antibióticos em amostras de farinha de aves submetidas ao processo de extração assistida por microondas (30°C, 15 min) dopadas com uma massa de antibiótico norfloxacin, ciprofloxacina e enrofloxacin de 1,0 µg. Foram	

- utilizados como solventes o metanol sem acidificação (cinza claro), metanol com 1% de ácido fórmico (cinza escuro) e metanol com 5% de ácido fórmico (preto). (n=5)..... 31
- Figura 10 - Cromatograma de amostra de farinha de mamíferos, extraída em extração assistida por microondas com uma mistura água:acetonitrilo:hexano (15:35:50% v/v). (1) Farinha não dopada antes da extração assistida por microondas; (2) farinha dopada com (A) minociclina, (B) oxitetraciclina, (C) tetraciclina 1 mg L⁻¹ antes de extração assistida por microondas; e (3) amostra dopada com (A) minociclina, (B) oxitetraciclina, (C) tetraciclina 0.45 mg L⁻¹ antes da injeção em HPLC..... 33
- Figura 11 - Taxas de recuperação (%) do antibiótico enrofloxacin em amostras de farinha de aves (cinza) e penas (preto) submetidas ao processo de SPE com diferentes cartuchos (HLB – n=3), (Sílica – n=1) e (Sílica+ HLB – n=1) 34
- Figura 12 - Taxas de recuperação (%) do antibiótico enrofloxacin em amostras de farinha de penas (cinza) e aves (preto) submetidas ao processo de SPE em que foi administrada diferente massa de antibiótico no cartucho HLB. (n=3). 35
- Figura 13 - Cromatograma de amostra de farinha de mamíferos (A), aves (B) e penas (C), não dopada. 37
- Figura 14 - Cromatogramas de amostras de farinha de (1) mamíferos, (2) aves e (3) penas, não dopadas antes do processo de extração assistida por microondas, mas dopadas com (A) norfloxacin, (B) ciprofloxacina e (C) enrofloxacin, com uma concentração de 1,0 mg L⁻¹, antes da injeção no HPLC. Tempo de retenção de A: 10,4 min; Tempo de retenção de B: 10,6 min; Tempo de retenção de C: 11,2 min. 38
- Figura 15 - Taxa de recuperação (%) dos antibióticos norfloxacin, ciprofloxacina e enrofloxacin na farinha de mamífero dopada antes do processo de extração assistida por microondas (cinza claro), antes do processo de secagem (cinza escuro) e antes da injeção no HPLC (preto). (n=5)..... 40
- Figura 16 - Taxa de recuperação (%) dos antibióticos norfloxacin, ciprofloxacina e enrofloxacin quando as amostras são dopadas antes do processo de MAE (cinza claro), antes do processo de secagem e ressuspensão (cinza escuro) e antes da injeção no HPLC (preto). (n=5) 41
- Figura 17 - Taxa de recuperação (%) dos antibióticos norfloxacin, ciprofloxacina e enrofloxacin na farinha de penas dopada antes do processo de extração assistida por microondas (cinza claro), antes do processo de secagem e ressuspensão (cinza escuro) e antes da injeção no HPLC (preto). (n=5). 43
- Figura 18 – 1 - Cromatograma de amostra de farinha de mamíferos, dopada com concentração de 1 mg L⁻¹ antes de extração assistida por micro-ondas. Oxitetraciclina (B) e tetraciclina

(C). Tempo de retenção de B: 10,1 min; Tempo de retenção de C: 10,6 min. 2 - Cromatograma de amostra de farinha de mamíferos dopada com concentração de 1 mg L⁻¹ antes de extração assistida por micro-ondas, com posterior dopagem com 0,45 mg L⁻¹ antes da injeção em HPLC. Minociclina (A), oxitetraciclina (B) e tetraciclina (C). Tempo de retenção de A: 8,4 min; Tempo de retenção de B: 10,1 min; Tempo de retenção de C: 10,7 min..... 45

Figura 19 – 1 - Cromatograma de amostra extraída por microondas de farinha de mamíferos, dopada com concentração de 1 mg L⁻¹ antes de SPE. Minociclina (A), oxitetraciclina (B) e tetraciclina (C). Tempo de retenção de A: 8,4 min; Tempo de retenção de B: 10,1 min; Tempo de retenção de C: 10,7 min. 2 - Cromatograma de amostra de farinha de mamíferos dopada com concentração de 1 mg L⁻¹ antes de SPE com posterior dopagem com 0,45 mg L⁻¹ antes da injeção em HPLC. Minociclina (A), oxitetraciclina (B) e tetraciclina (C). Tempo de retenção de A: 8,4 min; Tempo de retenção de B: 10,1 min; Tempo de retenção de C: 10,7 min. 46

Figura 20 – 1 - Cromatograma de amostra de farinha de aves dopada com concentração de 1 mg L⁻¹ antes de extração assistida por microondas. Minociclina (A), oxitetraciclina (B) e tetraciclina (C). Tempo de retenção de A: 8,4 min; Tempo de retenção de B: 10,1 min; Tempo de retenção de C: 10,7 min. 2- Cromatograma de amostra de farinha de aves dopada com concentração de 1 mg L⁻¹ antes de extração assistida por microondas, com posterior dopagem com 0,45 mg L⁻¹ antes da injeção em HPLC. Minociclina (A), oxitetraciclina (B) e tetraciclina (C). Tempo de retenção de A: 8,4 min; Tempo de retenção de B: 10,1 min; Tempo de retenção de C: 10,7 min..... 48

Figura 21 – 1 - Cromatograma de amostra de farinha de aves sujeita a extração assistida por microondas e dopada com concentração de 1 mg L⁻¹ antes de SPE. Minociclina (A), oxitetraciclina (B) e tetraciclina (C). Tempo de retenção de A: 8,4 min; Tempo de retenção de B: 10,1 min; Tempo de retenção de C: 10,7 min. 2 - Cromatograma de amostra de farinha de aves sujeita a extração assistida por microondas e dopada com concentração de 1 mg L⁻¹ antes de SPE com posterior dopagem com 0,45 mg L⁻¹ antes da injeção em HPLC. Minociclina (A), oxitetraciclina (B) e tetraciclina (C). Tempo de retenção de A: 8,4 min; Tempo de retenção de B: 10,1 min; Tempo de retenção de C: 10,7 min. 49

Figura 22 - 1 - Cromatograma de amostra de farinha de penas dopada com concentração de 1 mg L⁻¹ antes de extração assistida por microondas. Oxitetraciclina (B) e tetraciclina (C). Tempo de retenção de B: 10,1 min; Tempo de retenção de C: 10,7 min. 2- Cromatograma de amostra de farinha de penas dopada com concentração de 1 mg L⁻¹ antes de extração assistida por microondas, com posterior dopagem com 0,45 mg L⁻¹ antes da injeção em

HPLC. Minociclina (A), oxitetraciclina (B) e tetraciclina (C). Tempo de retenção de A: 8,4 min; Tempo de retenção de B: 10,1 min; Tempo de retenção de C: 10,7 min..... 51

Figura 23 - 1 - Cromatograma de amostra de farinha de penas sujeita a extração assistida por microondas e dopada com concentração de 1 mg L⁻¹ antes de SPE. Minociclina (A), oxitetraciclina (B) e tetraciclina (C). Tempo de retenção de A: 8,4 min; Tempo de retenção de B: 10,1 min; Tempo de retenção de C: 10,7 min. 2 - Cromatograma de amostra de farinha de penas sujeita a extração assistida por microondas e dopada com concentração de 1 mg L⁻¹ antes de SPE com posterior dopagem com 0,45 mg L⁻¹ antes da injeção em HPLC. Minociclina (A), oxitetraciclina (B) e tetraciclina (C). Tempo de retenção de A: 8,4 min; Tempo de retenção de B: 10,1 min; Tempo de retenção de C: 10,7 min. 52

Lista de abreviaturas

D

DAD – Diode Array Detector (Detetor de rede de díodo)

DNA – Deoxyribonucleic acid (Ácido desoxirribonucleico)

E

EU – European Union (União europeia)

H

HACCP – Hazard Analysis and Critical Control Point (Análise de perigo e controlo de pontos críticos)

HPLC – High performance liquid chromatography (Cromatografia líquida de alta eficiência)

L

LOD – Limite de deteção

LMR – Limites máximos de resíduos

LOQ – Limite de quantificação

M

MAE – Microwave assisted extraction (Extração assistida por microondas)

R

RTM – Rotações por minuto

S

SPE – Solid-phase extraction (Extração em fase sólida)

T

tRNA – Transfer ribonucleic acid (Ácido ribonucleico de transferência)

1. Introdução

1.1. Produção e utilização de antibióticos

Com uma população em crescimento e necessidade de mais recursos alimentares, persistem as preocupações sobre a ameaça potencial de doenças transmitidas por alimentos. Esta necessidade de mais recursos leva a constantes alterações no setor primário (agricultura, pesca, pecuária). A ponto de melhorar e acelerar a produção de bens são necessárias constantes alterações nas técnicas de produção já existentes. Estas alterações visam suprir a necessidade de alimento em massa num curto espaço de tempo. A demanda de mais alimento implica uma adaptação das empresas que se dedicam ao setor pecuário e agrícola. [1,2] As empresas dão resposta às necessidades da população adquirindo táticas de produção intensiva e, por exemplo, no caso do setor pecuário, é imprescindível o controlo veterinário dos produtos para uma melhor resposta aos parâmetros de qualidade exigidos. [2,4,5]

Para este grau de qualidade ser atingido é necessário um cuidado no tratamento dos animais que, por vezes, necessitam de administração controlada de variadas substâncias químicas diretamente nos espécimes ou juntamente com a sua alimentação. [6,7,8]

Antibióticos, agentes quimioterapêuticos que inibem ou suprimem o crescimento de micro-organismos, tais como bactérias, fungos ou protozoários, são utilizados no combate a diversas patologias e são essenciais para tratamento veterinário. [9] Embora tenham sido usados para promoção de crescimento animal (técnica praticada em alguns países dos Estados Unidos da América e América do Sul) este tipo de utilização foi banido nos países da União Europeia. A utilização dos antibióticos para tratamento de doenças resulta numa produção com menores perdas económicas. [6,10,12,13]

O aumento da aplicação de antibióticos em explorações de criação de animais, a par do crescimento socioeconómico, aumentou preocupações em torno do bem-estar animal e bem-estar humano. Crescente adoção de modelos de produção, enfatizando economias de escala, chamaram a atenção para a degradação ambiental e os custos sociais subsequentes. O aumento de sensibilidade para com este tema levou à necessidade de conhecer os efeitos que estes compostos químicos possam ter nas

espécies onde são aplicados, na saúde dos seres humanos, principal consumidor dos mesmos, e, por fim, a nível ambiental, em geral, onde por inúmeras vias podem acabar depositados. [14,15,16]

O antibiótico pode ter duas origens: a natural e a artificial. Muitos antibióticos são produzidos por bactérias no solo ou fungos. Atualmente, os antibióticos são maioritariamente obtidos por síntese química ou por modificação de compostos de origem natural.

Os constantes avanços tecnológicos verificados na medicina humana, assim como veterinária, conduzem, ano após ano, à descoberta de novas substâncias ativas com potencial terapêutico em sistemas vivos, ampliando assim a gama de fármacos existentes. Estes fármacos podem ser classificados em cinco categorias: antibióticos, analgésicos e anti-inflamatórios, hormonas, compostos químicos utilizados em desinfecção e compostos de desregulação endócrina. [14,17]

Na classe dos antibióticos, atualmente cerca de 250 diferentes entidades químicas estão registadas para utilização em medicina e medicina veterinária. [18]

Antibióticos que sejam suficientemente não tóxicos para o hospedeiro são utilizados como agentes quimioterapêuticos no tratamento de doenças infecciosas em humanos, animais e plantas.

Um dos problemas mais estudado que tem como origem a utilização de antibióticos em produção em massa de animais é a resistência microbiana humana. O antibiótico não produz a resistência, no entanto, ele fornece um ambiente que a favorece onde uma subpopulação já existente possa desenvolver-se.

Por mais de uma década, as comunidades científicas e médicas alertaram os consumidores sobre o uso excessivo de antibióticos, especialmente para cuidados pediátricos e produção animal. Antibióticos utilizados como agentes de promoção de crescimento para as indústrias de gado e aves provavelmente contribuíram significativamente para o problema da resistência aos antibióticos. Tanto na Europa como nos Estados Unidos, estudos mostraram que a transferência de agentes patogénicos resistentes a múltiplas drogas ocorre entre animais e os seres humanos através do consumo. [19]

1.2. Resíduos de antibióticos no ambiente

Existe a possibilidade de ocorrência, nos seres humanos e outros animais, de resíduos de pesticidas e substâncias veterinárias, contidos nos géneros alimentícios. Estes podem afetar adversamente a saúde e bem-estar, muitas vezes de maneiras que não se tornam imediatamente aparentes.

É fundamental que o uso de medicamentos veterinários seja feito de tal forma, e sob tais métodos de controlo, que a segurança dos consumidores seja garantida.

O sistema de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controlo (HACCP) para gestão da segurança alimentar tem sido amplamente adotado pela indústria de fabricação de alimentos. A ocorrência em todo o mundo de vários acidentes relativos à segurança dos alimentos, com origem a nível da exploração, chamou a atenção para a necessidade de gerenciar a segurança alimentar em todos os níveis da cadeia alimentar e, quando apropriado, adotar métodos sistemáticos de gestão da segurança alimentar a nível da exploração. [20]

Consequentemente, muitas autoridades de saúde pública e de segurança alimentar agora recomendam o uso de HACCP na produção agrícola de alimentos. O sistema HACCP deve ser realizado em conjunto com as boas práticas agrícolas, que fornece uma base para HACCP, da mesma forma que boas práticas de fabricação são usadas para apoiar HACCP nas indústrias de processamento de alimentos e fabricação. [20]

Grande parte do foco em questões de segurança alimentar é a intoxicação alimentar microbiana e a sua redução é considerada uma prioridade chave. [21,22]

Além das questões microbianas de segurança alimentar, a indústria alimentar e os consumidores devem preocupar-se com as questões da contaminação química dos alimentos. Existem muitas fontes de contaminação química que podem afetar a segurança dos alimentos. Dada a natureza do sistema de produção global de alimentos hoje e a dependência do abastecimento de alimentos e consumidores, os métodos intensivos de agricultura, pesticidas e substâncias veterinárias são um motivo de preocupação em matéria de risco químico e segurança alimentar. [21,22]

Se substâncias veterinárias forem utilizadas de forma adequada e de acordo com os regulamentos que as regem, devem, em princípio, não representar mais do que um nível aceitável de risco.

Muitos tipos de substâncias veterinárias são utilizados na produção de alimentos para animais para o tratamento de infecções e doenças, para aumentar a produtividade e rendimento. Se utilizados sob as condições certas, com as taxas corretas e desde que os intervalos de segurança apropriados sejam observados, pouco risco deve existir para os consumidores de carne proveniente de animais tratados.

1.3. Limites máximos de resíduos (LMR) para medicamentos veterinários na EU

Os medicamentos veterinários, em geral, têm de satisfazer três critérios principais, antes de serem autorizados, licenciados ou aprovados; estes critérios são a qualidade, eficácia e segurança. [23,24,25]

Tecidos de animais e outros produtos como, por exemplo, leite e mel, destinam-se a consumo por seres humanos.

As autoridades reguladoras precisam ter conhecimento de que os resíduos de medicamentos veterinários que podem persistir nos tecidos comestíveis após o abate ou que são excretados no leite ou se encontram no mel, não provocarão respostas tóxicas em consumidores que têm comido esses produtos.

As autoridades que regulam uma grande variedade de substâncias químicas, reconheceram uma série de estudos toxicológicos ou, mais precisamente, testes de toxicidade, que lhes permitem caracterizar as propriedades tóxicas das substâncias que visam regular e, muitas vezes, mas não sempre, identificar concentrações ou doses que servem como limites de segurança. Índices quantitativos também foram identificados para permitir que concentrações seguras dessas substâncias sejam identificáveis em alimentos de origem animal. [26]

Na UE, os medicamentos veterinários são submetidos a um sistema de requisitos legais rigorosos, a fim de demonstrar a segurança, qualidade e eficácia.

No entanto, antes de qualquer medicamento veterinário, destinado a ser utilizado em animais de produção, poder ser autorizado, deve primeiro cumprir os requisitos dos anexos do Regulamento No. (CEE) 2377/90, o chamado Regulamento LRM (Tab.1). [27]

O objetivo principal desta legislação é assegurar que as substâncias farmacologicamente ativas, uma definição que inclui outros componentes do medicamento, além do ingrediente ou ingredientes ativos, são adequadamente avaliados quanto ao seu potencial tóxico, e que os consumidores de alimentos de origem animal são adequadamente protegidos. De fato, essas avaliações levam em conta mais fatores além da toxicidade. Propriedades farmacológicas que podem ser desejáveis para o animal tratado, podem não ser desejáveis se ocorrem no consumidor que tenha comido produtos de origem animal.

Os resíduos de drogas veterinárias podem ser compostos pela substância original e vários metabolitos. Estas estão sujeitas a vários processos metabólicos como a eventual conversão para produtos metabólicos não tóxicos, incluindo água e, eventualmente, dióxido de carbono, e excreção na urina, ar expirado ou bile. Em outras palavras, irão, eventualmente, diminuir a concentração com o passar do tempo, como um resultado do metabolismo do animal. Assim, os riscos decorrentes de resíduos de um medicamento veterinário não dependem apenas das suas atividades tóxicas, farmacológicas e microbiológicas, e dos metabolitos, mas também da sua taxa de desaparecimento no animal.

Por conseguinte, outro fator importante é a capacidade de medir a concentração da droga e dos seus metabolitos que, por sua vez, depende da existência de um método analítico adequado.

Tabela 1 – Limites máximos de resíduos em tecidos alvo dos antibióticos enrofloxacin, oxitetraciclina e tetraciclina legislados no Regulamento No. (CEE) 2377/90. [27]

Substância farmacologicamente ativa	Resíduo marcador	Espécie animal	LMR µg/kg	Tecidos alvo
Enrofloxacin	Soma da enrofloxacin e da ciprofloxacina	Todas as espécies destinadas à produção de alimentos, à exceção de bovinos, ovinos, caprinos, suínos, coelhos e aves de capoeira	100	Músculo
			100	Tecido adiposo
			200	Fígado
			200	Rins
		Bovinos, ovinos, caprinos	100	Músculo
			100	Tecido adiposo
			300	Fígado
			200	Rins
		Suínos e coelhos	100	Músculo
			100	Tecido adiposo
			200	Fígado
			300	Rins
Oxitetraciclina	Soma do princípio ativo e do seu 4-epímero	Todas as espécies destinadas à produção de alimento	100	Músculo
			300	Fígado
			600	Rins
			100	Leite
			200	Ovos
Tetraciclina	Soma do princípio ativo e do seu 4-epímero	Todas as espécies destinadas à produção de alimento	100	Músculo
			300	Fígado
			600	Rins
			100	Leite
			200	Ovos

1.4. Antibióticos utilizados na exploração pecuária

Uma diversidade de antibióticos é utilizada na exploração pecuária como, por exemplo, beta-lactonas, fluoroquinolonas, tetraciclina, sulfonamidas, lincosamidas, diaminopirimidinas, polipéptidos, ionóforos, entre outros. [28]

O controlo veterinário nas explorações de criação de animais para abate e consumo, pode ser feito com recurso a antibióticos da família das tetraciclina, tais como tetraciclina e oxitetraciclina. Na criação de aves podem ser usadas fluoroquinolonas, tal como a enrofloxacin e ciprofloxacina. [27]

1.4.1. Fluoroquinolonas

As quinolonas são antibióticos utilizados na exploração pecuária e não devem ser utilizadas em animais produtores de ovos para consumo humano. [27]

Os primeiros medicamentos antimicrobianos do grupo das quinolonas, a chamada primeira geração de quinolonas, são representados por ácidos oxolínico e nalidíxico.

O ácido nalidíxico foi introduzido na clínica médica em 1964, especialmente para o tratamento de infeções provocadas por bactérias gram-negativas do trato urinário.

Na segunda geração de quinolonas, as fluoroquinolonas são tipicamente representadas pela ciprofloxacina e enrofloxacin. [29]

Fluoroquinolonas são drogas bactericidas sintéticas com atividade contra microorganismos gram-negativos e gram-positivos. Podem ser divididas em três gerações e diferem das quinolonas originais por possuírem um átomo de flúor adicional na estrutura química. O seu mecanismo de ação dá-se pela inibição da DNA girase, enzima que produz super espiralamento negativo no DNA.

As principais indicações clínicas das fluoroquinolonas são: infeção complicada das vias urinárias, infeções respiratórias causadas por *P. aeruginosa* em pacientes com fibrose cística, otite externa invasiva causada por *P. aeruginosa*, osteomielite bacilar gram-negativa crónica, entre outros.

As fluoroquinolonas importantes utilizadas na medicina veterinária são flumequina, enrofloxacin, sarafloxacin, danofloxacin, orbifloxacin, ibafloxacin e arbofloxacin.

A fluoroquinolona mais utilizada em animais consumíveis é a enrofloxacin (Fig. 1C). [30]

A ciprofloxacina (Fig. 1B) é o principal metabolito da enrofloxacin.

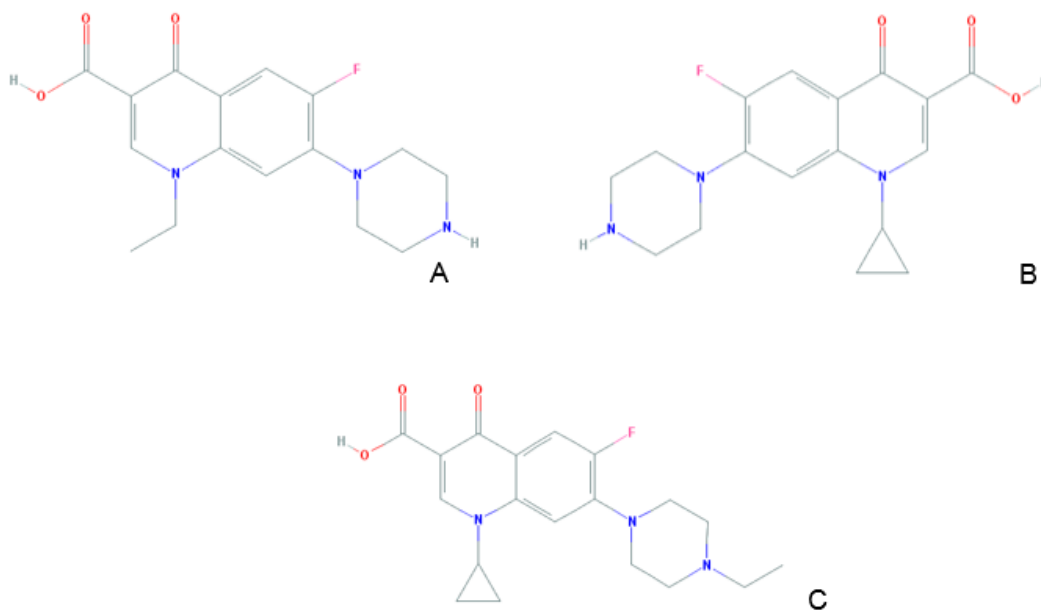


Figura 1 - Estrutura química da norfloxacin (A), ciprofloxacina (B) e enrofloxacin (C). Adaptado de National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database [31, 32, 33]

1.4.2. Tetraciclina

As tetraciclina foram descobertas durante os anos 40 do século XX, a sua administração começou durante a década seguinte, visto serem compostos com poucos efeitos colaterais. O seu mecanismo de ação dá-se pela inibição da síntese proteica de forma preventiva na anexação do ácido ribonucleico de transferência aminoacil (tRNA-aminoacil) no local aceitador do ribossoma. [34, 35]

Em animais, a sua aplicação é como bactericida em animais de grande porte, como mamíferos e também em aves, ou a nível do tratamento de infeções respiratórias em suínos. [36, 37]

A tetraciclina (Fig. 2C) é um composto farmacológico com papel antibiótico registado para o tratamento veterinário de todas as espécies animais destinadas à produção de alimentos. [27]

Alguns dos genes que conferem resistência à tetraciclina, acabam também por conferir resistência dos microorganismos a outras tetraciclinas como é o caso da minociclina [35] (Fig. 2A).

O controlo veterinário, nomeadamente nas grandes explorações de criação de gado para futuro consumo humano (bovinos, suínos), recorrendo a compostos farmacológicos da família das tetraciclinas, já não é feito apenas com a administração do antibiótico-base, tetraciclina, mas também optando por ou agrupando com suas formas substituídas, nomeadamente a minociclina [38] e oxitetraciclina [35,39].

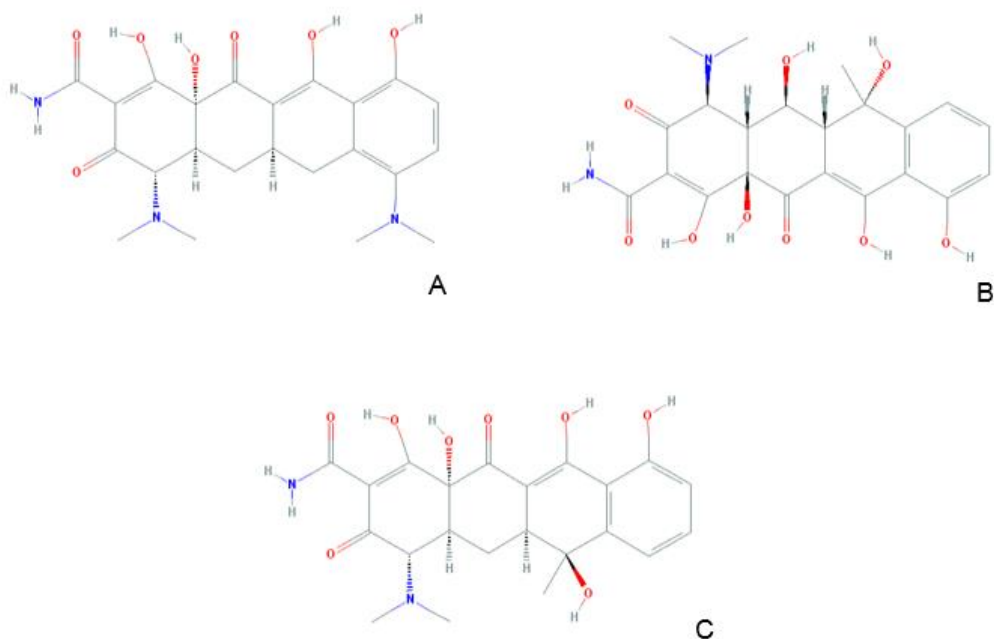


Figura 2 - Estrutura química da minociclina (A), oxitetraciclina (B) e tetraciclina (C). Adaptado de National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database [40, 41, 42].

1.5. Detecção e quantificação de antibióticos veterinários em produtos de origem animal

A detecção e quantificação de antibióticos veterinários, em matrizes complexas, exige a sua extração e a utilização de um processo de quantificação seletivo e sensível, dado que se encontram, normalmente, em concentrações muito baixas. [43]

1.5.1. Complexidade de matriz

A complexidade da matriz está relacionada com as diferentes substâncias presentes na amostra a estudar que não sejam o analito de interesse.

Os efeitos da matriz, isto é, as interferências provenientes da matriz particular contendo o analito a ser determinado, dificultam a respetiva detecção e quantificação. As dificuldades aumentam quando os analitos a serem medidos se encontram em matrizes sólidas e líquidas e têm de ser extraídos, tais como alimentos, culturas, plantas, solos, sedimentos, soro, urina, tecidos, etc. [44, 45]

Dependendo das propriedades físico-químicas do analito e da sua ocorrência na superfície ou disperso numa matriz particular, um solvente adequado deve ser selecionado, opcionalmente em combinação com uma técnica de extração adequada.

Contudo, na realidade, eliminar o efeito de matriz é muito complicado e, dependendo da complexidade desta, várias técnicas de extração e limpeza são geralmente utilizadas.

As matrizes de farinhas de origem animal são complexas, uma vez que se encontram no estado sólido e podem provir de diferentes produtos tais como ossos, penas de aves, etc. Daí, constituir um desafio a determinação de antibióticos neste tipo de matriz e a utilização destas matrizes como matriz de teste, dopando-as com o analito de interesse (antibióticos). Assim, é imprescindível o recurso a técnicas de extração e limpeza adequadas.

1.5.2. Métodos de extração dos antibióticos veterinários em matrizes biológicas complexas

A presença no ambiente de compostos farmacológicos com potenciais perigos para algumas espécies leva a uma necessidade de desenvolver e otimizar métodos de quantificação desses fármacos, bem como a identificação inequívoca dos analitos alvo de estudo. É importante, por isso, que os métodos desenvolvidos sejam rápidos, sensíveis e precisos, que permitam ultrapassar as interferências provenientes da matriz e a posterior quantificação do analito de interesse.

Muitas técnicas de extração e determinação podem ser utilizadas, dependendo da matriz e do analito em causa. No caso das farinhas de animais que têm uma matriz muito complexa é necessária uma técnica que permita uma eficiente extração dos antibióticos, pois estes analitos, eventualmente, existem em concentrações muito baixas.

A extração de antibióticos em matrizes biológicas complexas é usualmente feita com misturas hidroorgânicas, contendo metanol ou acetonitrilo. [43]

A agitação mecânica, por vezes combinada com ultra-sons, é uma técnica de extração comum mas os procedimentos podem requerer muito manuseamento da amostra porque estão, geralmente, envolvidas várias etapas de extração.

Para fins de extração, podem ser utilizadas técnicas como a extração assistida por microondas (MAE), extração em fase sólida (SPE), extração líquido-líquido, entre outras. [43]

Dada a complexidade das matrizes, é frequentemente inevitável a limpeza dos extratos, sendo a SPE a técnica de uso mais comum. Por vezes, é aplicada uma limpeza com multi-etapas, combinando duas SPE com diferentes mecanismos de interação ou SPE com extração líquido-líquido. [43]

Extração em fase sólida (SPE) é uma técnica simples, realizada num cartucho que contém a fase sólida (estacionária) imobilizada entre duas membranas de retenção. As etapas de desenvolvimento da SPE são: acondicionamento ou ativação da fase extratora; aplicação da amostra; lavagem da coluna para eliminação dos interferentes da matriz; eluição e colheita dos analitos.

A capacidade de separação da SPE baseia-se na afinidade preferencial do analito ou da impureza pela fase estacionária. Quando comparada com os métodos convencionais de extração, a utilização da SPE oferece vantagens, tais como: realização simultânea dos processos de purificação e pré-concentração da amostra; redução do consumo de solventes; retenção seletiva dos analitos de interesse; proteção da coluna analítica, entre outras [47]

A extração assistida por microondas (MAE) dá-se em vasos fechados e pode ocorrer a temperaturas e pressões elevadas. A eficiência da MAE é influenciada pela escolha de diversos parâmetros de extração, nomeadamente o solvente, a temperatura e o tempo de extração [46]. O solvente de extração é um parâmetro importante na otimização do processo. Deve-se ter em conta as propriedades de absorção das microondas pelo solvente em interação com a matriz e a afinidade do analito pelo solvente. O volume de solvente deve ser suficiente para garantir que toda a amostra é imersa [46].

1.5.3. Métodos de quantificação dos antibióticos veterinários em matrizes biológicas complexas

A análise das amostras finais, já tratadas (extratos), tem um papel vital nos resultados obtidos. Uma das técnicas mais utilizadas é a cromatografia líquida acoplada a diferentes tipos de detetores. Detetores convencionais incluem aqueles com base em propriedades óticas (absorção de radiação ultravioleta e detetor de fluorescência) ou químicas (deteção eletroquímica). O recurso a cromatografia acoplada a deteção por espectrometria de massa permite a identificação do analito e a obtenção de limites de quantificação e deteção mais baixos. Para melhorar ensaios cromatográficos, no entanto, um esforço considerável tem sido realizado para desenvolver técnicas de deteção sensíveis e seletivas [48].

. Usando técnicas, cromatográficas, análises totalmente automáticas podem ser realizadas de forma rápida e com elevada precisão.

1.6. Objetivo

O trabalho teve como objetivo a otimização de métodos de extração, limpeza e pré-concentração para a análise dos antibióticos norfloxacin, ciprofloxacina, enrofloxacin, em farinhas de aves e penas, e dos antibióticos minociclina, oxitetraciclina, tetraciclina, em farinhas de mamíferos. Estas farinhas são produzidas através do tratamento de subprodutos de categoria 3, nomeadamente penas, vísceras e ossos resultantes da desmancha de animais para consumo humano. Durante a produção podem ter sido administrados a estes animais enrofloxacin ou tetraciclina para tratamento de eventuais infeções.

2. Material e Métodos

2.1. Material e reagentes

Metanol (CHROMASOLV® para HPLC, 99,9% de pureza) e ácido fórmico (98% de pureza) foram adquiridos à Sigma-Aldrich (USA) e acetonitrilo (LC-MS Grade) adquirido à Fisher Scientific (UK)

Antibióticos, minociclina, oxitetraciclina, tetraciclina, norfloxacin, ciprofloxacina e enrofloxacin, com um elevado grau de pureza (> 90%) foram comprados a Sigma-Aldrich (USA).

Todos os restantes reagentes foram de qualidade analítica.

Usou-se nitrogénio comprimido da Air Liquide (Madrid, Espanha).

Para descontaminação todo o material (plástico e vidro) foi lavado com detergente, enxaguado abundantemente com água desionizada e deixado em banho ácido nítrico (Pronalab) 20% (v/v), durante a noite. Posteriormente foi lavado com água desionizada e seco em câmara de fluxo laminar à temperatura ambiente.

2.2. Amostras de farinha

As amostras de farinhas de penas foram cedidas pela empresa Avicasal S.A. e as amostras de farinhas de aves e de mamíferos foram cedidas pela empresa Savinor, S.A.

2.3. Soluções padrão de antibióticos

Soluções padrão stock individuais de cada antibiótico (1000 mg L⁻¹) foram preparadas dissolvendo a massa apropriada do composto em metanol. Duas soluções padrão de mistura de três antibióticos cada, uma com minociclina, oxitetraciclina e tetraciclina,

outra com norfloxacin, ciprofloxacina, e enrofloxacin, foram preparadas mensalmente em metanol a partir das soluções stock anteriores com a concentração de 50 mg L⁻¹. Todas as soluções padrão foram mantidas a -20°C num frasco âmbar para evitar fotodegradação.

2.3.1. Secagem

Para testar a perda de antibiótico no processo de secagem por fluxo baixo de nitrogénio, foram preparadas soluções padrão de mistura dos antibióticos norfloxacin, ciprofloxacina e enrofloxacin com a massa de 2,5 µg de cada antibiótico e de minociclina, oxitetraclina e tetraciclina com a massa de 0,5 µg de cada antibiótico, em metanol com 5% de ácido fórmico, num volume de 5 mL.

Posteriormente, estas soluções foram secas em banho-maria com temperatura de 30°C e sob um fluxo baixo de nitrogénio.

O resíduo foi ressuspensionado com uma mistura de solução aquosa de 1% de ácido fórmico e metanol, na proporção 75/25 (v/v), num volume de 1 mL.

2.3.2. Extração em fase sólida (SPE)

Estes testes foram realizados com cartuchos Oásis HLB (60mg/ 3cc) da Waters Corporation (Milford, MA, EUA), utilizando um sistema de vácuo SUPELCO, VISIPREP™ (ESPANHA).

Os cartuchos Oásis HLB foram condicionados com 5 mL de metanol e 5 mL de água, passando, seguidamente, 5 mL da amostra. O cartucho foi então lavado com 5 mL de solução metanol/água 5/95 (v/v) e deixado sob vácuo durante 30 minutos. O passo da eluição foi feito com 5 mL de solução metanol/ácido fórmico 95/5 (v/v). As amostras foram secas a 30°C por fluxo baixo de nitrogénio. Este procedimento foi baseado num procedimento previamente otimizado [7].

2.3.3. Filtração

Testou-se a filtração de soluções com filtros de fibra de vidro (0,45µm, FIORONI®, Ingré, França), celulose (0,45µm, Millipore, Irlanda) e polipropileno (0,45µm, Whatman®, Reino Unido).

Para os antibióticos norfloxacin, ciprofloxacina e enrofloxacin foram testadas a filtração por filtro de fibra de vidro, celulose e polipropileno de soluções com massa de antibiótico de 0,1; 0,2; 0,4; 0,6 e 1,0 µg, num volume de 5 mL.

Para os antibióticos minociclina, oxitetraciclina e tetraciclina apenas foi testada a filtração por filtro de fibra de vidro de soluções com massa de antibiótico de 0,1; 0,2; 0,4 e 0,6 µg, num volume de 1 mL.

2.4. Amostras de farinhas

2.4.1. Extração assistida por microondas

A extração assistida por micro-ondas foi feita num equipamento ETHOS 1, da Milestone Inc. (Shelton, CT, EUA).

Foram testadas diferentes condições de extração das amostras das farinhas de origem animal.

Dois gramas de farinha foram pesados para um frasco de microondas e foram dopados com 20 µL, 200 µL ou 400 µL de uma solução de mistura de três antibióticos, norfloxacin, ciprofloxacina e enrofloxacin ou minociclina, oxitetraciclina, e tetraciclina, com uma concentração de 50 mg L⁻¹, em metanol.

Para os antibióticos norfloxacin, ciprofloxacina e enrofloxacin utilizaram-se 10 mL de solução metanol/ ácido fórmico 95/5 (v/v), e para uma extração de 15 minutos, testaram-se as temperaturas 30°C, 40°C e 50°C, para as farinhas de penas e aves, e 30°C e 40°C, para a farinha de mamíferos. Para os antibióticos minociclina, oxitetraciclina e tetraciclina foram realizadas extrações utilizando 10 mL de solução

metanol/ ácido fórmico 95/5 (v/v), para uma extração de 15 minutos, com a temperatura de 30°C para as três farinhas. Este procedimento foi baseado num procedimento previamente otimizado [7, 49].

Posteriormente, testou-se também a extração durante 15 minutos e a 30°C, usando 10 mL de solução metanol/ácido fórmico 99/1 (v/v) ou metanol sem acidificação, para a farinha de aves com os antibióticos norfloxacin, ciprofloxacina e enrofloxacin.

Para a farinha de mamíferos, meio grama de farinha foi pesado para um frasco de microondas e posteriormente dopado com 400 µL de uma solução mistura de três antibióticos minociclina, oxitetraciclina e tetraciclina com uma concentração de 50 mg L⁻¹, usando uma mistura de água:acetonitrilo:hexano (15:35:50 v/v). A extração foi feita durante 15 minutos e a 30°C.

As soluções obtidas após extração assistida por microondas foram centrifugadas (SELECTA® MIXTASEL Barcelona, Espanha) a 2000 RPM durante 5 minutos, e o sobrenadante foi colocado em frascos de âmbar para posterior processamento.

Quando se usou o solvente água:acetonitrilo:hexano realizou-se uma primeira centrifugação, que permitiu separar e descartar o hexano. Seguidamente, esta solução foi submetida a outra centrifugação de 2000 rpm durante 5 minutos. Este procedimento foi baseado num previamente utilizado [50].

2.4.2. SPE

Diferentes massas das amostras extraídas no microondas foram testadas para extração por SPE nos cartuchos Oásis HLB (60mg/ 3cc). Para tal 0.5 mL, 1 mL, 5 mL de amostra proveniente da extração assistida por microondas foram diluídos a um volume final de 5, 20 ou 250 mL com solução aquosa 1% ácido fórmico, respetivamente e passados pelos cartuchos (condicionados com 5 mL de metanol e 5 mL de água). A eluição foi feita com 5 mL de solução metanol/ácido fórmico 95/5% (v/v). As amostras foram secas a 30°C por fluxo baixo de nitrogénio. O procedimento foi adaptado de procedimentos previamente otimizados [15, 16].

Usando cartuchos Grace Sílica condicionados com 5 mL de n-hexano, passaram-se, seguidamente, 5 mL da amostra proveniente da extração assistida por microondas. O cartucho foi então lavado com 5 mL de metanol e deixado sob vácuo durante 30 minutos. O passo da eluição foi feito com 5 mL de solução água/ácido fórmico 99/1% (v/v).

Testou-se ainda a limpeza da amostra passando-a inicialmente pelo cartucho de sílica, tal como descrito anteriormente, sendo a solução eluída passada pelo cartucho Oásis HLB, tal como descrito anteriormente.

As soluções eluídas dos cartuchos foram secas por fluxo baixo de nitrogénio, como descrito acima, sendo ressuspendidas numa mistura de solução aquosa de 1% de ácido fórmico e metanol, na proporção 75/25 (v/v), ou somente em solução aquosa de 1% de ácido fórmico (99:1 v/v).

2.5. Cromatografia líquida de fase reversa com detetor DAD

A análise foi feita usando um HPLC Beckman Coulter com detetor DAD (modulo 168) e um amostrador automático (módulo 508). Os analitos foram separados numa coluna C18 Kinetex TM (100 mm x 4,6 mm, i.d. 2,6 mm) utilizando como fase móvel A água: ácido fórmico a 99/1% (v/v) e como fase móvel B acetonitrilo. O programa utilizado foi: 100 % de eluente A mantendo condições isocráticas durante 2 min, seguido de um gradiente linear até 70 % de eluente B durante 9 min. Finalmente, as condições iniciais foram novamente atingidas em 7 minutos. O fluxo foi fixado em 1 mL min⁻¹ durante os dois minutos iniciais, seguindo-se um fluxo de 0,8 mL min⁻¹ até aos 11 minutos, voltando ao fluxo inicial durante os 7 minutos finais. O volume de injeção da amostra foi de 50 µL e o sinal foi monitorizado a $\lambda = 280$ nm. Estas condições foram adaptadas de procedimentos previamente otimizados [7, 15, 16].

2.6. Análise estatística

Os tempos de retenção dos analitos assim como as áreas dos picos observados nos cromatogramas foram registados.

Utilizando o método de calibração linear, obtida com soluções padrão dos diferentes antibióticos, foram calculadas as concentrações ou massas de cada antibiótico nas diferentes soluções. Para cada teste efetuado foram posteriormente calculados as médias e desvios padrão dessas concentrações ou massas. Diferenças para um nível de significância de 95% foram avaliadas através do teste t de student, ou de uma ANOVA (neste caso realizou-se posteriormente o teste Tukey para comparação de médias).

A taxa de recuperação dos antibióticos foi calculada através do método de calibração linear. As retas de calibração foram obtidas através do processamento de amostras dopadas apenas antes da injeção no HPLC.

Os valores de LOD e LOQ foram obtidos através das fórmulas apresentadas a seguir, onde σ representa o desvio padrão residual e m representa o declive da reta.

$$\text{LOD} = \frac{3\sigma}{m}$$

$$\text{LOQ} = \frac{10\sigma}{m}$$

Todos os cálculos necessários foram realizados usando o Microsoft Excel 2010 (Microsoft Corporation Redmond, WA, EUA).

3. Resultados e discussão

3.1. Soluções padrão de antibióticos

A partir da solução mistura dos três antibióticos (minociclina, oxitetraciclina, tetraciclina ou norfloxacin, ciprofloxacina, enrofloxacin) foram preparadas e analisadas soluções padrão em duas gamas de concentração (0,1- 0,6 mg L⁻¹ e 1- 6 mg L⁻¹). Assim, foi possível verificar que o método usado permitia distinguir entre cada um dos três antibióticos injetados numa mesma corrida (Fig. 3).

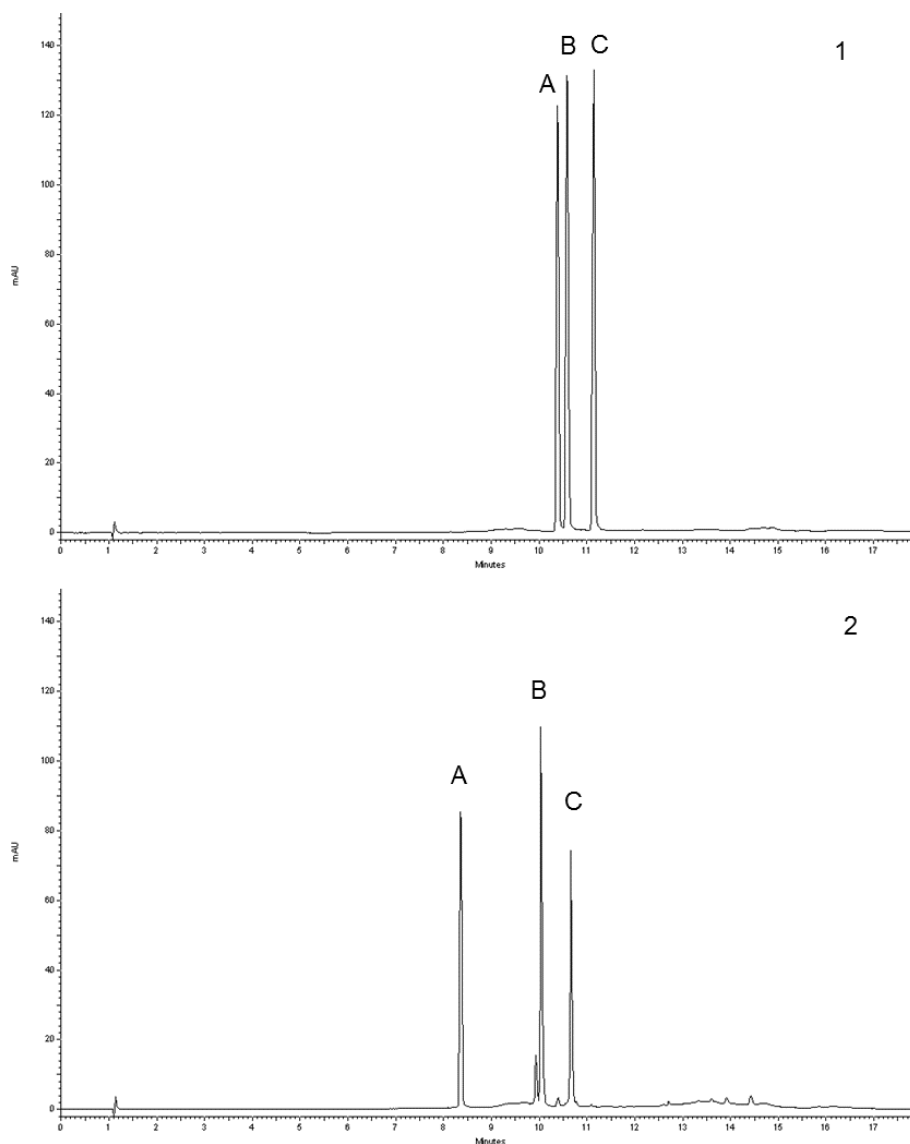


Figura 3 – 1 - Cromatograma típico de uma solução padrão mistura de concentração 1 mg L^{-1} de norfloxacin (A), ciprofloxacin (B) e enrofloxacin (C). Tempo de retenção de A: 10,4 min; Tempo de retenção de B: 10,6 min; Tempo de retenção de C: 11,2 min; 2 - Cromatograma típico de uma solução padrão mistura de concentração 3 mg L^{-1} de minociclina (A), oxitetraciclina (B) e tetraciclina (C). Tempo de retenção de A: 8,4 min; Tempo de retenção de B: 10,1 min; Tempo de retenção de C: 10,7 min.

Os resultados obtidos permitiram também concluir que se observa resposta linear nos intervalos de concentrações utilizados para todos os antibióticos (Tabela 2).

Tabela 2 - Parâmetros das retas de regressão linear e limites de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ) para os antibióticos norfloxacin, ciprofloxacina, enrofloxacin e minociclina, oxitetraclina, tetraciclina. R² sendo o coeficiente de correlação.

Antibiótico	Gama de concentração	Declive	Ordenada na origem	(R ²)	LOD (mg L ⁻¹)	LOQ (mg L ⁻¹)
Norfloxacin	0,1- 0,6 mg L ⁻¹	521241 ± 3738	-9794 ± 3674	0,999	0,02	0,07
Ciprofloxacina		630226 ± 5324	-2221 ± 5233	0,999	0,03	0,08
Enrofloxacin		590468 ± 4591	-9921 ± 4512	0,999	0,02	0,08
Norfloxacin	1- 6 mg L ⁻¹	529793 ± 83329	-5070 ± 81904	0,997	0,5	1,6
Ciprofloxacina		627566 ± 85946	22958 ± 84477	0,997	0,4	1,4
Enrofloxacin		626447 ± 72515	-44856 ± 71275	0,998	0,3	1,2
Minociclina	0,1- 0,6 mg L ⁻¹	78350 ± 6447	-6733 ± 9848	0,922	0,2	0,8
Oxitetraclina		89000 ± 6877	-2082 ± 10504	0,922	0,2	0,8
Tetraciclina		136218 ± 11615	-606 ± 17742	0,922	0,3	0,9
Minociclina	1- 6 mg L ⁻¹	120406 ± 20673	-37212 ± 20320	0,996	0,5	1,7
Oxitetraclina		195769 ± 34694	-48980 ± 34101	0,996	0,5	1,8
Tetraciclina		227519 ± 35311	-47041 ± 34707	0,997	0,5	1,6

As diferenças dos valores obtidos para os declives das retas de calibração da gama mais baixa de concentrações comparativamente aos valores da gama mais alta foram significativas (t test, p ≤ 0.05), o que levou a concluir que devem ser utilizadas duas retas de calibração para as duas diferentes gamas de concentração estudadas.

Este facto foi tido em atenção no trabalho posterior, nomeadamente aquando da dopagem da farinha.

3.2. Recuperação de antibióticos de soluções padrão

3.2.1. Secagem

Para se testar a perda de antibiótico na técnica de secagem por baixo fluxo de nitrogénio prepararam-se amostras de antibióticos norfloxacin, ciprofloxacina e enrofloxacin com a massa de 2,5 µg e de minociclina, oxitetraciclina e tetraciclina com a massa de 0,5 µg, em metanol. As taxas de recuperação dos antibióticos após a secagem encontraram-se no intervalo 80 – 120% de recuperação (Fig. 4).

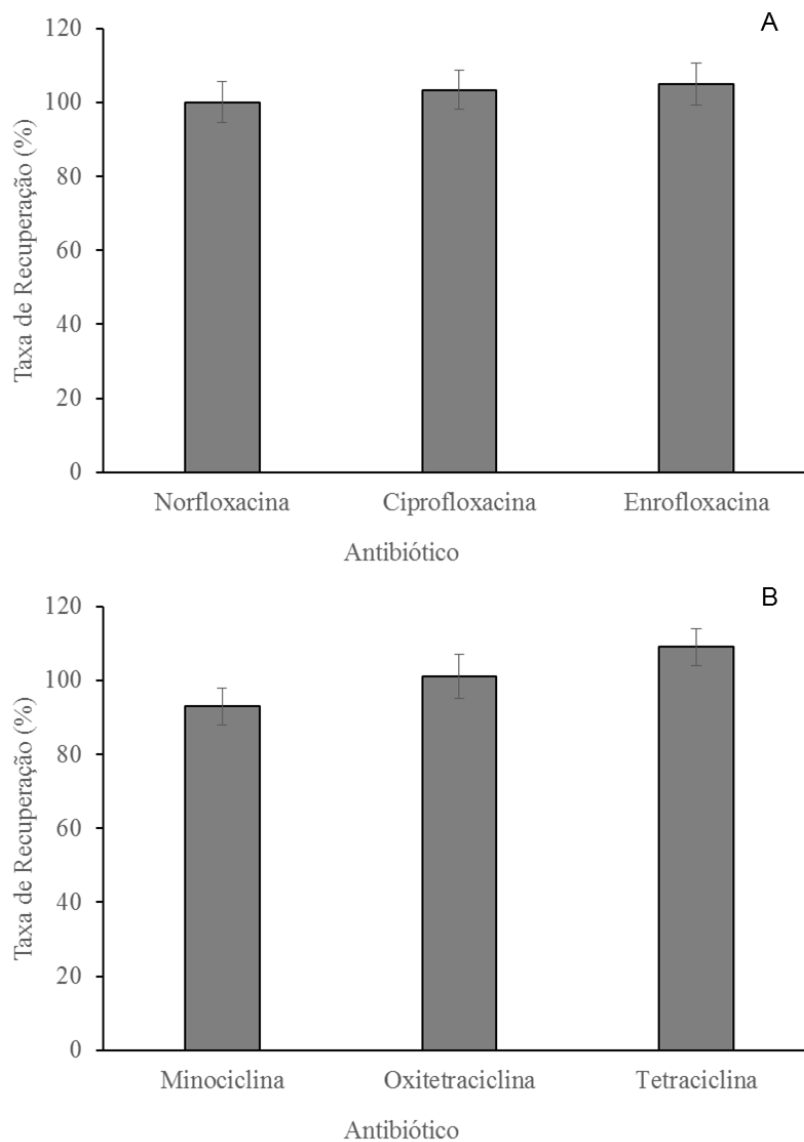


Figura 4 - Taxas de recuperação (%) dos antibióticos de soluções padrões submetidas ao processo de secagem sob baixo fluxo de nitrogénio. (A) Padrão com massa de 2,5 µg de norfloxacin, ciprofloxacina e enrofloxacin (n=5). (B) Padrão com massa de 0,5 µg de minociclina, oxitetraciclina e tetraciclina (n=3).

Registou-se uma percentagem média de recuperação para norfloxacin de $100 \pm 6\%$, para ciprofloxacina de $103 \pm 5\%$ e para enrofloxacin de $105 \pm 6\%$. Registou-se uma percentagem média de recuperação para minociclina de $93 \pm 5\%$, para oxitetraciclina de $101 \pm 6\%$ e para tetraciclina de $109 \pm 5\%$ (fig.4).

Todos os cálculos de percentagem de recuperação de massa foram feitos tendo por base as retas de calibração apresentadas anteriormente.

Considerou-se portanto que o processo de secagem não influenciava a quantificação dos antibióticos.

3.2.2. Filtração

O processo de filtração foi testado com o intuito de eliminar das amostras a turbidez ou impurezas, antes de serem injetadas no HPLC.

Para os antibióticos norfloxacin, ciprofloxacina e enrofloxacin foram testadas a filtração por filtro de fibra de vidro, celulose e polipropileno para soluções com valores de massa de antibiótico de 0,1; 0,2; 0,4; 0,6 e 1,0 µg (Fig. 5), num volume de 5 mL.

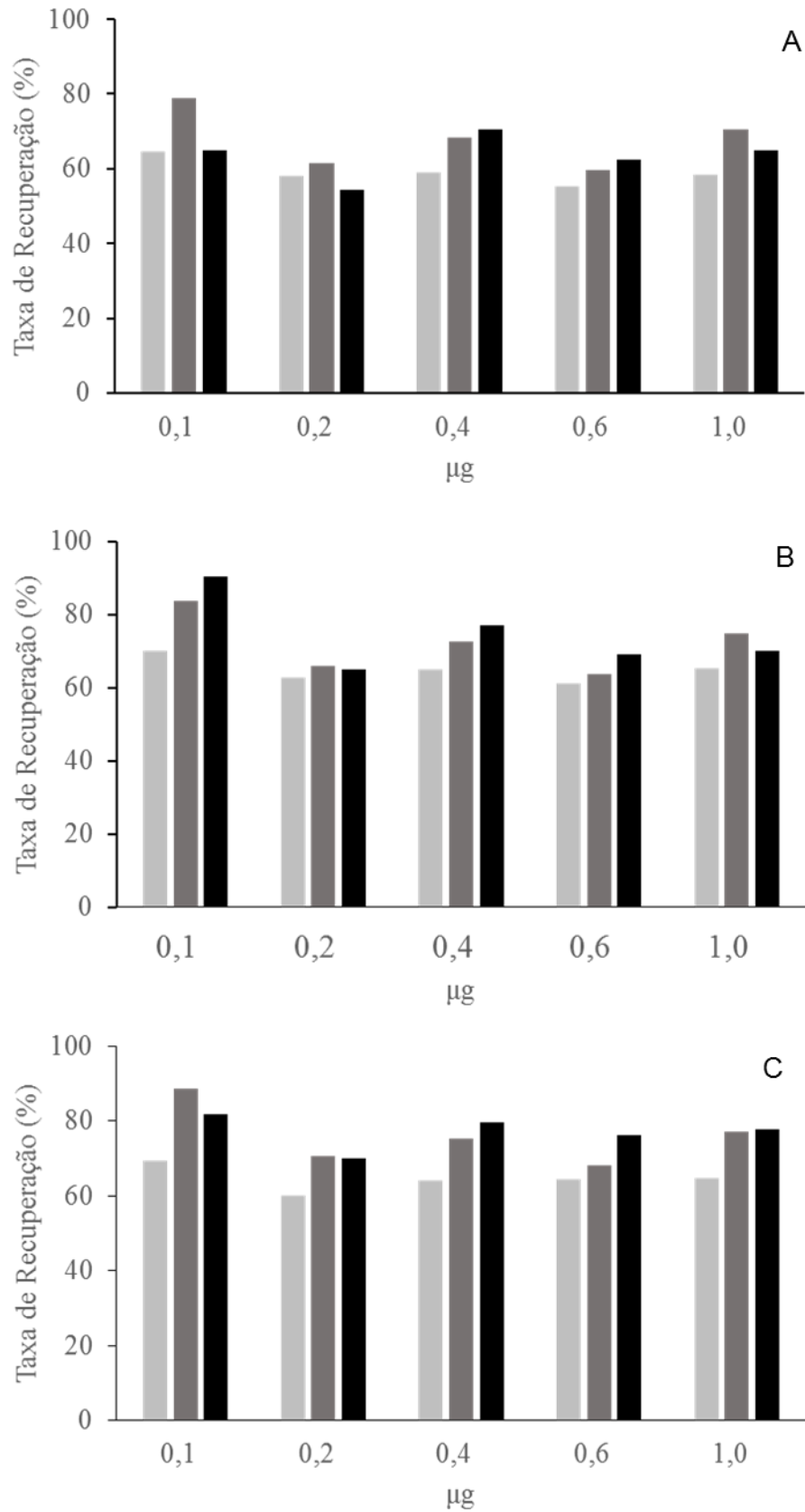


Figura 5 - Taxas de recuperação (%) dos antibióticos em padrões filtrados por filtros de fibra de vidro (cinza claro), celulose (cinza escuro) e polipropileno (preto) com diferentes massas de antibiótico (0,1; 0,2; 0,4; 0,6; 1,0 µg); (n = 1). (A) norfloxacin, (B) ciprofloxacin e (C) enrofloxacin.

Comparando as taxas de recuperação os resultados permitem concluir que os valores de recuperação dos antibióticos norfloxacin e ciprofloxacina não são estatisticamente diferentes (teste ANOVA) para os três filtros testados.

Para o antibiótico enrofloxacin existe uma diferença comparando os filtros de fibra de vidro com os de celulose e polipropileno. Um test tuckey permitiu concluir que os filtros de fibra de vidro apresentam valores de recuperação ligeiramente inferiores aos outros dois tipos de filtros testados.

As taxas de recuperação dos antibióticos após filtração encontram-se abaixo dos 80 % de recuperação.

Para os antibióticos minociclina, oxitetraciclina e tetraciclina a filtração por filtro de fibra de vidro foi testada para soluções de massa de antibiótico de 0,1; 0,2; 0,4; e 0,6 µg. Para o antibiótico oxitetraciclina obteve-se uma percentagem de recuperação média de $93\pm14\%$ e para o antibiótico tetraciclina $82\pm4\%$ (Fig. 6).

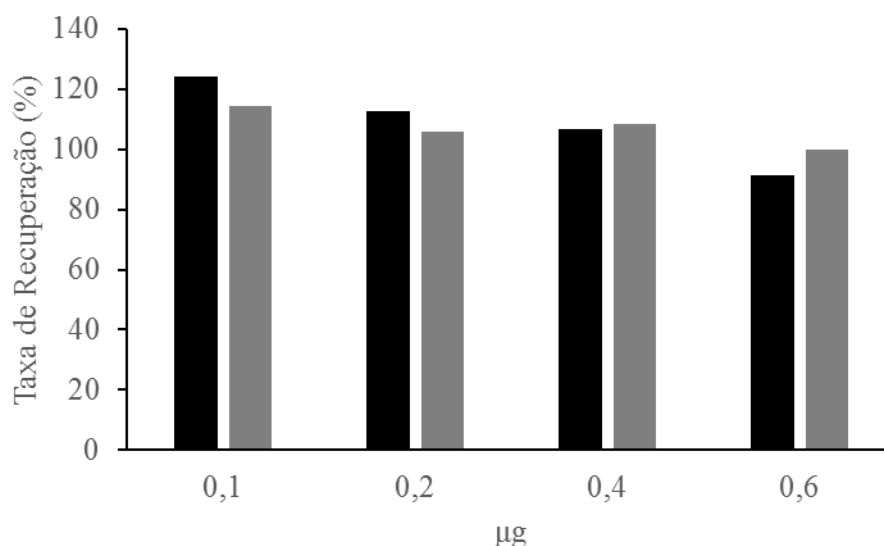


Figura 6 - Taxas de recuperação (%) dos antibióticos em padrões filtrados por filtros de fibra de vidro com diferentes massas de antibiótico (0,1; 0,2; 0,4; 0,6 µg); (n = 1) oxitetraciclina (cinza escuro) e tetraciclina (cinza claro).

Na análise dos cromatogramas correspondentes às amostras dos antibióticos minociclina, oxitetraciclina e tetraciclina observou-se o desaparecimento do pico referente ao antibiótico minociclina, não sendo, por isso, possível fazer a quantificação de valor de massa recuperada.

Todos os cálculos de percentagem de recuperação de massa foram feitos tendo por base as retas de calibração apresentadas anteriormente.

Considerou-se, portanto, que o processo de filtração influenciava a quantificação dos antibióticos, e que isso deveria ser tido em conta nomeadamente aquando da dopagem da farinha.

3.2.3. SPE

Foram testados cartuchos Oasis HLB com valores de massa de antibiótico de 2,0; 4,0; 5,0; e 6,0 µg para os antibióticos norfloxacin, ciprofloxacina e enrofloxacin e de 0,1; 0,2; 0,4; 0,6 e 1,0 µg para os antibióticos minociclina, oxitetraciclina e tetraciclina. Para o grupo das tetraciclinas neste trabalho, só se considerou importante fazer testes com a técnica de SPE para concentrações baixas, isto porque estudos anteriores indicavam que a mesma técnica de extração dos mesmos compostos, quando utilizadas concentrações mais altas, apresentava percentagens de recuperação superiores a 90% [16].

As amostras resultantes foram secas, como descrito anteriormente, antes de serem injetadas no HPLC.

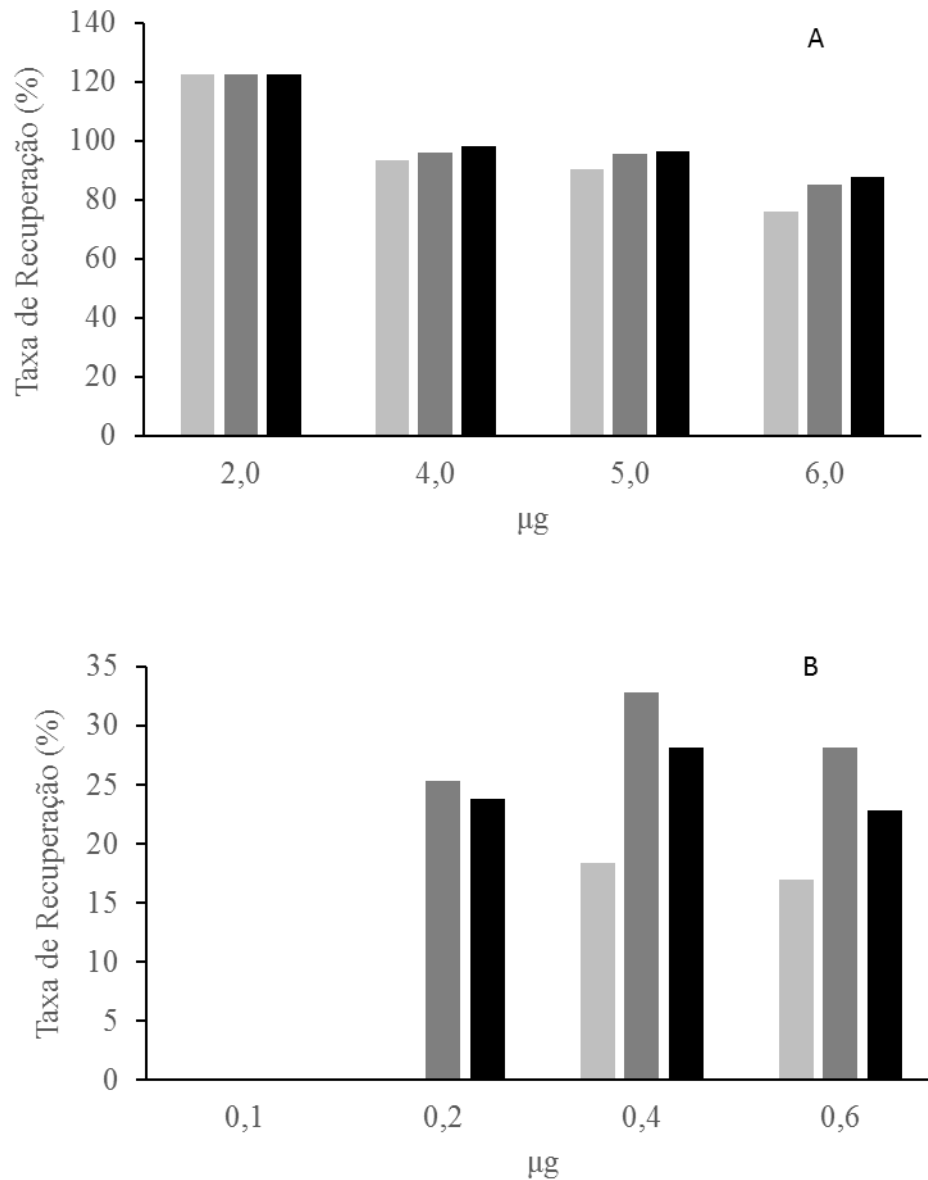


Figura 7 - Taxas de recuperação (%) dos antibióticos em padrões que foram submetidas ao processo de SPE A - norfloxacin (cinza claro), ciprofloxacin (cinza escuro) e enrofloxacin (preto) (n=1). B - minociclina (cinza claro), oxitetraciclina (cinza escuro) e tetraciclina (preto) (n=1).

As taxas de recuperação dos antibióticos norfloxacin, ciprofloxacin e enrofloxacin, após SPE, encontram-se no intervalo dos 80 – 120%. (Fig. 7).

O SPE não teve influência na taxa de recuperação dos antibióticos norfloxacin, ciprofloxacin e enrofloxacin, na gama 2,0 a 6,0 µg.

As taxas de recuperação dos antibióticos minociclina, oxitetraciclina e tetraciclina, após SPE, encontram-se abaixo dos 40 % de recuperação. Na análise dos cromatogramas correspondentes às amostras dos antibióticos minociclina, oxitetraciclina e tetraciclina observou-se o desaparecimento do pico referente ao antibiótico minociclina para as massas mais baixas, não sendo, por isso, possível fazer a quantificação de valor de massa recuperada.

Verificou-se que para a gama mais baixa testada o SPE não apresentava recuperações aceitáveis. Assim, a gama de concentrações mais alta foi posteriormente escolhida para testes com as amostras de farinhas.

Todos os cálculos de percentagem de recuperação de massa foram feitos tendo por base as retas de calibração apresentadas anteriormente.

3.3. Recuperação de antibióticos de amostras de farinhas

3.3.1. Otimização da extração assistida por microondas (MAE)

Foi utilizado um tempo de extração de 15 minutos. As temperaturas testadas foram 30°C, 40°C e 50°C para a farinha de penas e aves e 30°C e 40°C para a farinha de mamíferos, ambas dopadas com uma massa de antibiótico norfloxacin, ciprofloxacina e enrofloxacin de 1,0 µg. A extração foi efetuada com uma solução metanol/ácido fórmico 95/5% (v/v).

Os cálculos das taxas de recuperação foram feitos usando retas de calibração feitas com amostras de farinha apenas dopadas antes da injeção no HPLC com as massas de 0,1; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 e 1,0 µg.

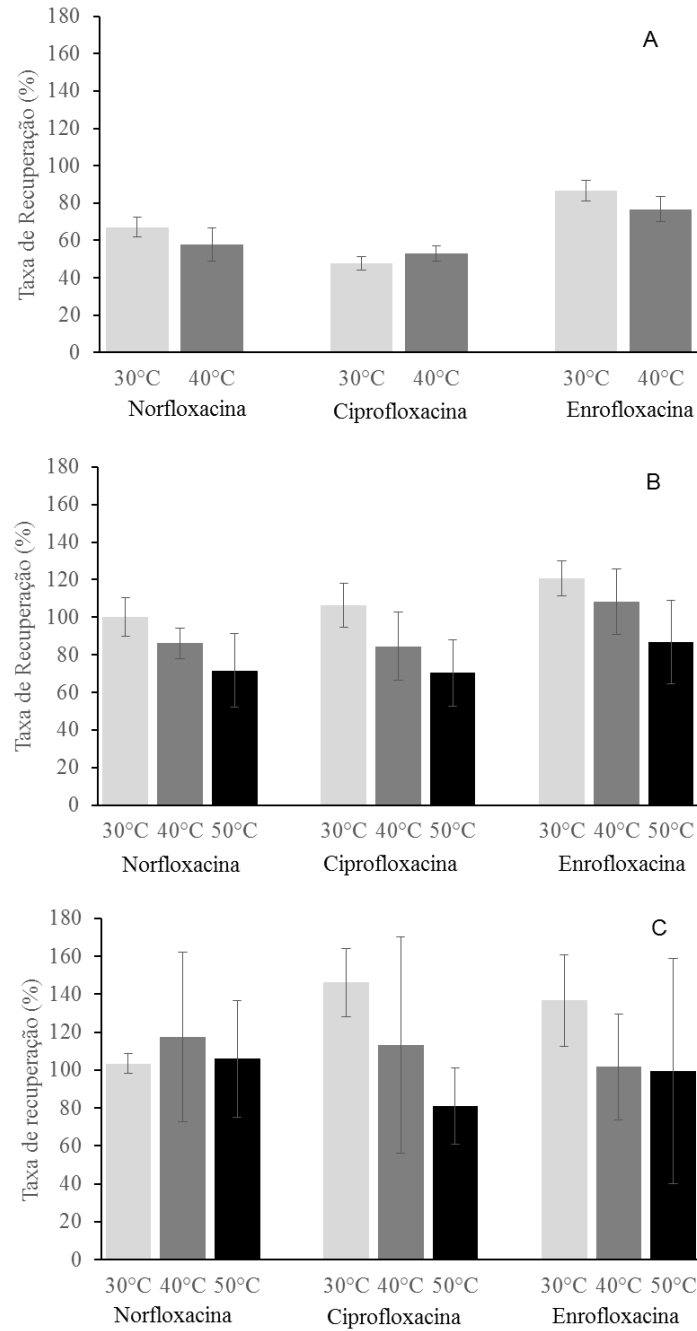


Figura 8 - Taxas de recuperação (%) dos antibióticos em amostras de farinha submetidas ao processo de extração assistida por microondas, usando metanol com 5% de ácido fórmico, e dopadas com uma massa de antibiótico norfloxacin, ciprofloxacin e enrofloxacin de 1,0 µg e seguidamente aos processos de SPE e secagem sob baixo fluxo de nitrogénio. (A) farinha de mamíferos (n=5), (B) farinha de penas (n=3) e (C) farinha de aves (n=3).

Como se pode observar nos gráficos (Fig. 8) existe uma diminuição da taxa de recuperação dos antibióticos à medida que a temperatura aumenta, mesmo não sendo significativa. Apesar dos resultados obtidos não serem estatisticamente diferentes a temperatura de trabalho escolhida foi 30°C, por ser uma temperatura em que as recuperações estavam dentro do intervalo pretendido (80-120%) para todas as farinhas e antibióticos testados.

Outro fator importante no processo de extração assistida por microondas é o solvente escolhido para a extração. Foram realizados testes para a farinha de aves usando solução metanol/ácido fórmico 95/5% (v/v), usando solução metanol/ácido fórmico 99/1% (v/v) e metanol sem acidificação, a 30°C e durante 15 min. Apresentam-se na figura 9 os dados obtidos.

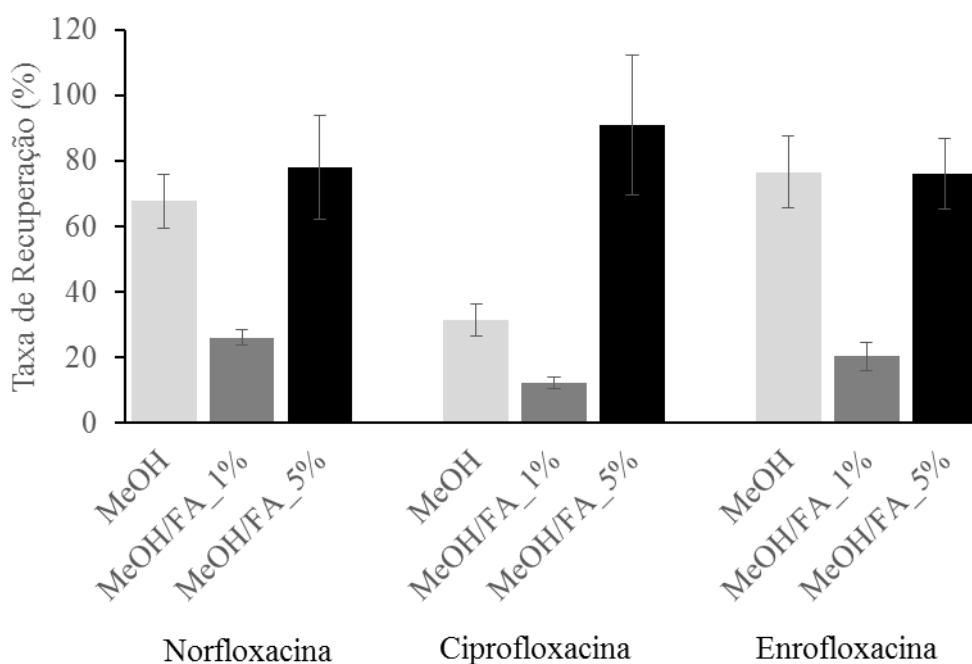


Figura 9 - Taxas de recuperação (%) dos antibióticos em amostras de farinha de aves submetidas ao processo de extração assistida por microondas (30°C, 15 min) dopadas com uma massa de antibiótico norfloxacin, ciprofloxacin e enrofloxacin de 1,0 µg. Foram utilizados como solventes o metanol sem acidificação (cinza claro), metanol com 1% de ácido fórmico (cinza escuro) e metanol com 5% de ácido fórmico (preto). (n=5).

Os resultados permitem concluir que o melhor processo de extração foi o efetuado com metanol/ácido fórmico 95/5% (v/v) sendo o único processo dos testados que permitiu obter recuperações no intervalo 80-120%. Embora para o antibiótico

enrofloxacin o solvente metanol sem acidificação também permita recuperações no intervalo de 80-120%, como a extração é feita conjuntamente, esta hipótese foi excluída. Como a acidificação máxima utilizada (5%) foi a que permitiu obter melhores resultados, será de realizar, futuramente, testes com um maior grau de acidificação para determinar a partir de que grau é que a extração dos antibióticos declina ou estaciona.

Para a extração assistida por microondas de minociclina, oxitetraciclina e tetraciclina, usando solução metanol/ácido fórmico 95/5% (v/v), verificou-se que os picos da oxitetraciclina e tetraciclina não se encontravam resolvidos e o da minociclina não aparecia nos cromatogramas.

Para tentar otimizar a extração destes antibióticos testou-se a farinha de mamíferos usando uma mistura de água:acetonitrilo:hexano (15:35:50% v/v), durante 15 minutos e a 30°C, com uma massa de farinha de 0,5 gramas e dopada com 400 µL de antibiótico.

Na Fig. 10 pode observar-se que os cromatogramas, obtidos para farinhas não dopadas antes da extração assistida por microondas, não permitem resolver os compostos de interesse da linha de base (Fig. 10 A), uma situação em tudo idêntica à que se obteve com a extração usando metanol/ácido fórmico 95/5% (v/v).

A farinha de mamíferos, dopada antes da MAE, apresenta cromatogramas em que os picos da oxitetraciclina e tetraciclina não se encontram resolvidos e a minociclina está ausente tal como acontecia no caso das extrações usando metanol/ácido fórmico 95/5% (v/v) (Fig. 10 B).

Dopando a mesma amostra antes da injeção no HPLC é possível verificar que os antibióticos apresentam picos no tempo de retenção característico (Fig. 10 C).

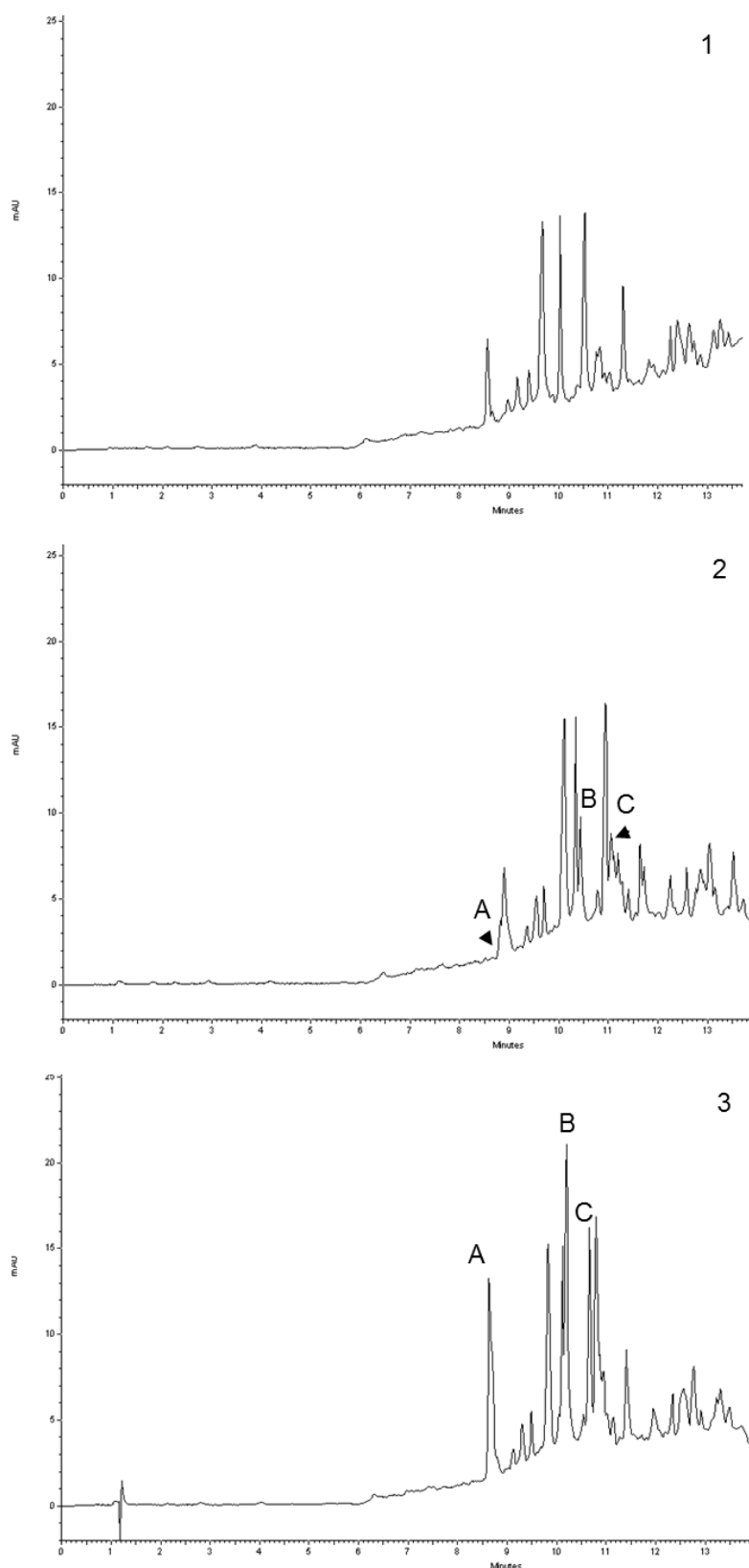


Figura 10 - Cromatograma de amostra de farinha de mamíferos, extraída em extração assistida por microondas com uma mistura água:acetonitrilo:hexano (15:35:50% v/v). (1) Farinha não dopada antes da extração assistida por microondas; (2) farinha dopada com (A) minociclina, (B) oxitetraciclina, (C) tetraciclina 1 mg L^{-1} antes de extração assistida por microondas; e (3) amostra dopada com (A) minociclina, (B) oxitetraciclina, (C) tetraciclina 0.45 mg L^{-1} antes da injeção em HPLC.

3.3.2. Otimização do processo de SPE

Neste teste foram avaliados dois tipos de cartucho de SPE diferentes: o cartucho de HLB e o cartucho de sílica, testando-se, para isso, farinhas de aves e de penas. Na Fig. 11 pode ver-se que a utilização de cartuchos HLB permite recuperações no intervalo 80-120%. Na Fig. 11 apresentam-se apenas resultados para o antibiótico enrofloxacin, dado que os outros antibióticos (norfloxacin e ciprofloxacin) se comportaram de forma semelhante.

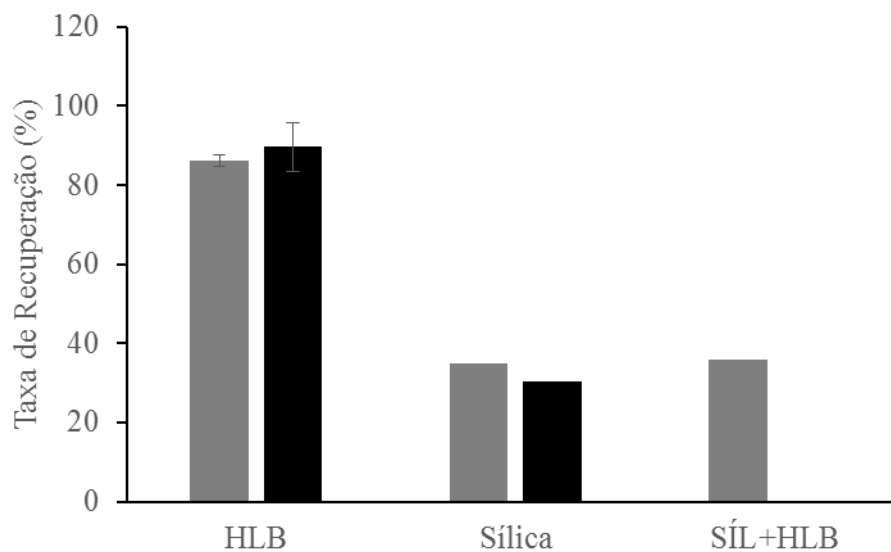


Figura 11 - Taxas de recuperação (%) do antibiótico enrofloxacin em amostras de farinha de aves (cinza) e penas (preto) submetidas ao processo de SPE com diferentes cartuchos (HLB – n=3), (Sílica – n=1) e (Sílica+ HLB – n=1)

Para a farinha de aves foi ainda testado um método em que a amostra eluída do cartucho de sílica era posteriormente passada pelo cartucho HLB. Os dados de recuperações obtidos após utilização de cartuchos de sílica mostram que os compostos de interesse eram perdidos na SPE (Fig. 11).

Os resultados obtidos permitiram escolher o cartucho HLB para o processamento das amostras.

Após a escolha do cartucho mais adequado para o processo de SPE foi realizado um teste para determinar a quantidade de antibiótico que permitiria obter melhores recuperações.

Na Fig. 12 pode ver-se que todas as massas testadas permitiram recuperações no intervalo 80-120%.

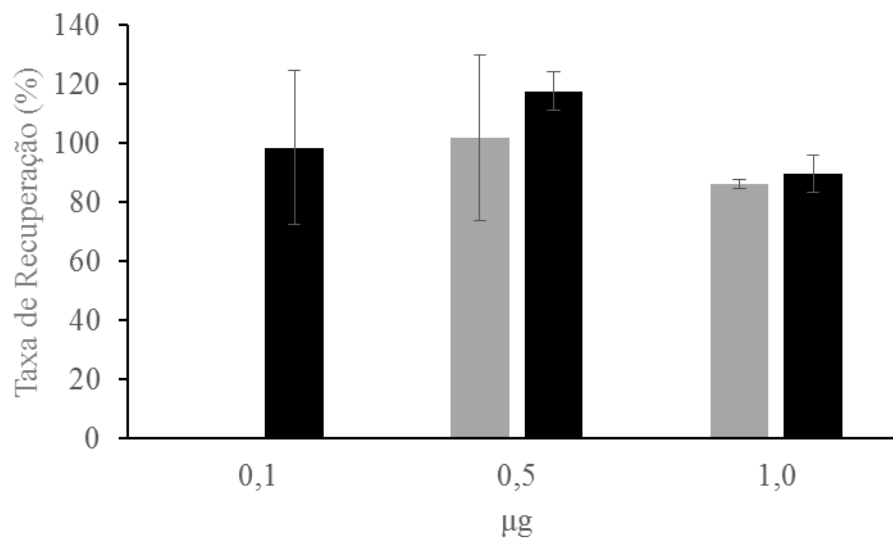


Figura 12 - Taxas de recuperação (%) do antibiótico enrofloxacin em amostras de farinha de penas (cinza) e aves (preto) submetidas ao processo de SPE em que foi administrada diferente massa de antibiótico no cartucho HLB. (n=3).

Foi ainda testada a massa de 2,0 µg. No entanto, este processo implicou passar 250 mL de amostra pelo cartucho, o que levou à colmatação do mesmo, inviabilizando a sua utilização. Na Fig. 12 apenas se apresenta os dados da enrofloxacin, porém os outros dois antibióticos testados juntamente (norfloxacin e ciprofloxacin) apresentam o mesmo tipo de comportamento.

3.3.3. Otimização do processo global de recuperação de antibióticos das farinhas

3.3.3.1. Fluoroquinolonas

A extração assistida por microondas usando solução metanol/ácido fórmico 95/5% (v/v), durante 15 min a 30°C, seguida de secagem e de SPE usando cartuchos HLB, foi o processo considerado mais eficiente e, por essa razão, o escolhido.

Amostras destas farinhas não dopadas antes de extração assistida por microondas e que sofreram o mesmo processo foram utilizadas e analisadas para verificar a presença de picos nos tempos de retenção dos compostos de interesse.

Na Fig. 13 pode ver-se que as amostras de farinha sem dopagem não apresentaram picos nos tempos de retenção dos compostos de interesse.

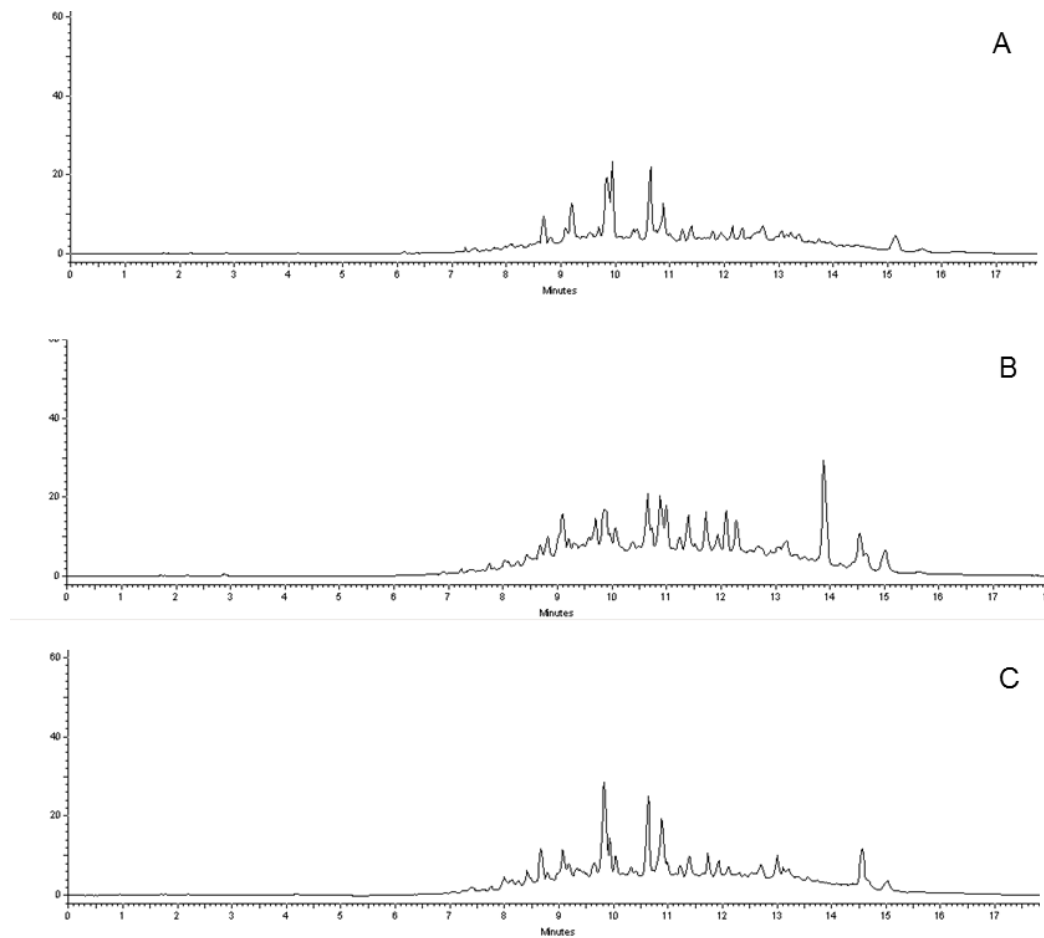


Figura 13 - Cromatograma de amostra de farinha de mamíferos (A), aves (B) e penas (C), não dopada.

Dopando estas amostras com concentrações apropriadas de solução padrão dos 3 antibióticos, antes da injeção no HPLC, pode-se comprovar que os picos dos antibióticos surgem bem resolvidos (Fig. 14). e nos mesmos tempos de retenção apresentados pelos padrões sem farinha apresentados na Fig. 3.

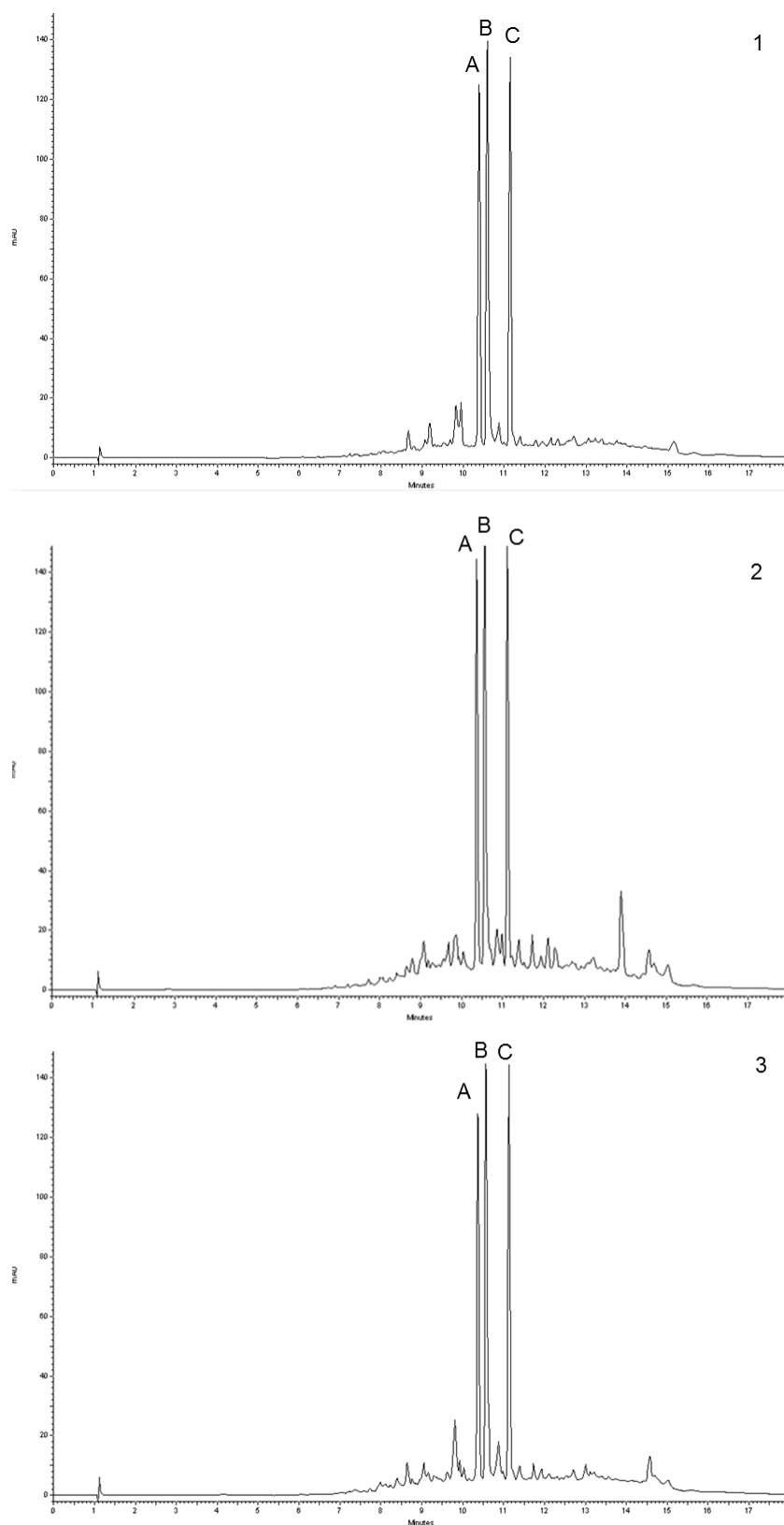


Figura 14 - Cromatogramas de amostras de farinha de (1) mamíferos, (2) aves e (3) penas, não dopadas antes do processo de extração assistida por microondas, mas dopadas com (A) norfloxacin, (B) ciprofloxacin e (C) enrofloxacin, com uma concentração de $1,0 \text{ mg L}^{-1}$, antes da injeção no HPLC. Tempo de retenção de A: 10,4 min; Tempo de retenção de B: 10,6 min; Tempo de retenção de C: 11,2 min.

Estas amostras foram também utilizadas para obter uma reta de calibração em matriz de cada farinha com massas de cada antibiótico de 0,1; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 e 1,0 µg, em que as amostras de farinha de mamíferos foram dopadas antes da injeção por HPLC.

Na Tabela 3 pode-se observar os parâmetros da reta de calibração para a farinha de mamíferos usada.

Tabela 3 - Parâmetros das retas de regressão linear e limites de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ) (gama mais baixa de concentrações) para os antibióticos norfloxacin, ciprofloxacina e enrofloxacin, na matriz de farinha de mamíferos.

Antibiótico	Declive	Ordenada na Origem	Coefficiente de Correlação (R ²)	LOD (mg L ⁻¹)	LOQ (mg L ⁻¹)
Norfloxacin	344267 ± 38992	15028 ± 23946	0,994	0,3	1,1
Ciprofloxacina	382044 ± 63272	61919 ± 38856	0,992	0,5	1,7
Enrofloxacin	467245 ± 38903	-11472 ± 23891	0,995	0,2	0,8

Posteriormente as amostras de farinha de mamíferos foram dopadas antes do processo de extração assistida por microondas ou antes do processo de secagem.

Os cálculos destas taxas de recuperação destas dopagens foram feitos usando uma reta de calibração cujos parâmetros se encontram na tabela 3.

Como é possível observar na Fig. 15 a taxa de recuperação dos antibióticos foi superior quando as amostras são dopadas antes da injeção no HPLC. Assim, for necessário fazer uma correção dos valores de recuperação para o processo de extração global, tendo em conta as perdas registadas no processo de extração assistida por microondas ou secagem.

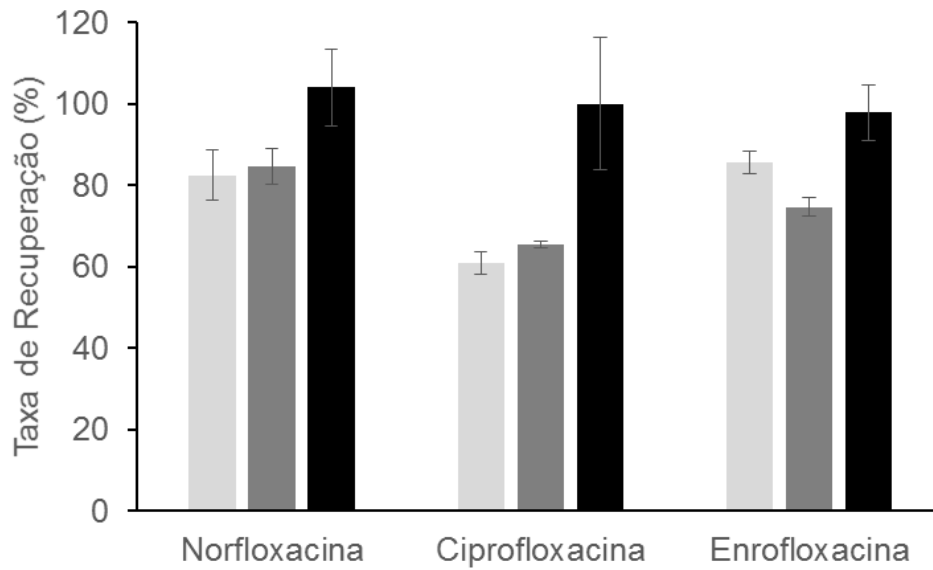


Figura 15 - Taxa de recuperação (%) dos antibióticos norfloxacin, ciprofloxacina e enrofloxacina na farinha de mamíferos, dopada antes do processo de extração assistida por microondas (cinza claro), antes do processo de secagem (cinza escuro) e antes da injeção no HPLC (preto). (n=5)

Para o antibiótico norfloxacin a taxa de recuperação do processo global foi de $83 \pm 6\%$.

Para o antibiótico ciprofloxacina a taxa de recuperação do processo global foi de $61 \pm 3\%$.

Para o antibiótico enrofloxacina a taxa de recuperação do processo global foi de $86 \pm 3\%$.

As amostras de farinha de aves foram também utilizadas para obter uma reta de calibração em matriz de cada farinha com massas de cada antibiótico de 0,1; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 e 1,0 μg , em que as amostras de farinha de aves foram dopadas antes da injeção por HPLC.

Na Tabela 4 pode-se observar os parâmetros da reta de calibração para a farinha de aves usada.

Tabela 4 - Parâmetros das retas de regressão linear e limites de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ) (gama mais baixa de concentrações) para os antibióticos norfloxacin, ciprofloxacina e enrofloxacin, na matriz farinha de aves.

Antibiótico	Declive	Ordenada na Origem	Coefficiente de Correlação (R ²)	LOD (mg L ⁻¹)	LOQ (mg L ⁻¹)
Norfloxacin	344351 ± 5697	2448 ± 3498	0,998	0,1	0,2
Ciprofloxacina	373173 ± 16565	34200 ± 10173	0,998	0,1	0,2
Enrofloxacin	452875 ± 8326	-10014 ± 5113	0,998	0,1	0,2

Posteriormente as amostras de farinha de aves foram dopadas antes do processo de extração assistida por microondas ou antes do processo de secagem.

Os cálculos destas taxas de recuperação destas dopagens foram feitos usando uma reta de calibração cujos parâmetros se encontram na tabela 4.

Como é possível observar na Fig. 16 a taxa de recuperação dos antibióticos foi maior à medida que a dopagem é feita ao longo do processo. Assim, for necessário fazer uma correção dos valores de recuperação para o processo de extração global, tendo em conta as perdas registadas no processo de extração assistida por microondas ou secagem.

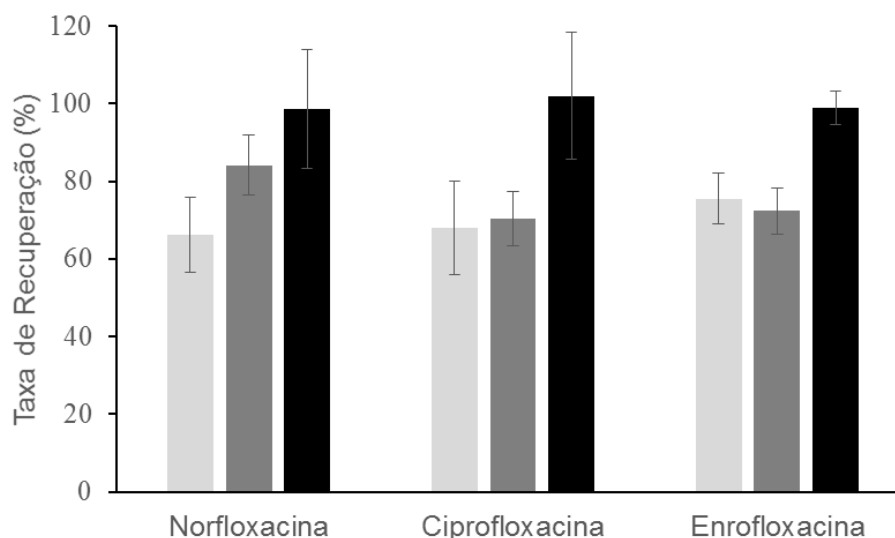


Figura 16 - Taxa de recuperação (%) dos antibióticos norfloxacin, ciprofloxacina e enrofloxacin quando as amostras são dopadas antes do processo de MAE (cinza claro), antes do processo de secagem e ressuspensão (cinza escuro) e antes da injeção no HPLC (preto). (n=5)

Como é possível observar na figura 16 a taxa de recuperação dos antibióticos é maior antes da injeção no HPLC. Assim, é possível, fazer a correção dos valores de recuperação para o processo de extração global.

Para o antibiótico norfloxacin a taxa de recuperação do processo todo é de $66 \pm 10\%$.

Para o antibiótico ciprofloxacina a taxa de recuperação do processo todo é de $68 \pm 12\%$.

Para o antibiótico enrofloxacin a taxa de recuperação do processo todo é de $76 \pm 7\%$.

Relativamente à farinha de penas, as amostras foram dopadas como descrito para os outros dois tipos de farinha. Estas foram calculadas usando a reta de calibração cujos parâmetros se resumem na tabela 5, apresentando-se, na figura 17, as taxas de recuperação obtidas com a dopagem antes do processo de extração assistida por microondas ou antes do processo de secagem.

Tabela 5 - Parâmetros das retas de regressão linear e limites de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ) (gama mais baixa de concentrações) para os antibióticos norfloxacin, ciprofloxacina e enrofloxacin, na matriz de farinha de penas

Antibiótico	Declive	Ordenada na Origem	Coefficiente de Correlação (R^2)	LOD (mg L^{-1})	LOQ (mg L^{-1})
Norfloxacin	406823 ± 16184	-8894 ± 9939	0,988	0,1	0,4
Ciprofloxacina	450344 ± 16721	-14905 ± 10268	0,991	0,1	0,4
Enrofloxacin	444739 ± 18638	-12867 ± 11446	0,987	0,1	0,4

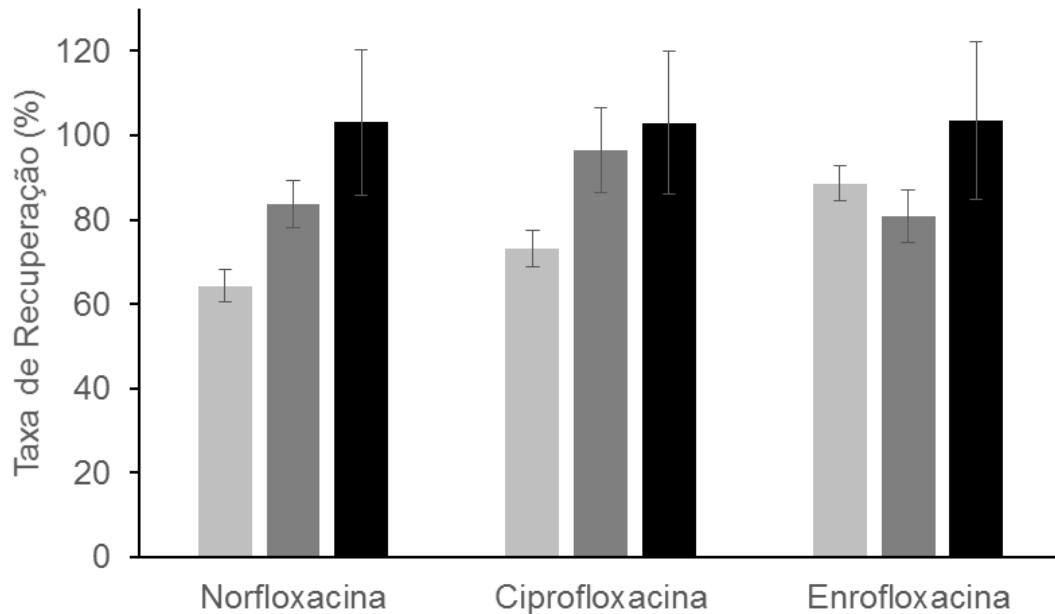


Figura 17 - Taxa de recuperação (%) dos antibióticos norfloxacina, ciprofloxacina e enrofloxacina na farinha de penas dopada antes do processo de extração assistida por microondas (cinza claro), antes do processo de secagem e ressuspensão (cinza escuro) e antes da injeção no HLPC (preto). (n=5).

Como é possível observar na figura 17 a taxa de recuperação dos antibióticos é maior antes da injeção no HPLC. Assim, é possível, fazer a correção dos valores de recuperação para o processo de extração global.

Para o antibiótico norfloxacina a taxa de recuperação do processo todo é de $64 \pm 4\%$.

Para o antibiótico ciprofloxacina a taxa de recuperação do processo todo é de $73 \pm 4\%$.

Para o antibiótico enrofloxacina a taxa de recuperação do processo todo é de $89 \pm 4\%$.

3.3.3.2. Tetraciclina

Analisando amostras de farinha de mamíferos dopadas com 1 mg L^{-1} de solução padrão dos antibióticos minociclina, oxitetraciclina e tetraciclina, antes do processo de extração assistida por microondas, verificou-se que os cromatogramas não revelavam picos para o tempo de retenção característico da minociclina, (Fig. 18).

Para os antibióticos oxitetraciclina e tetraciclina verificou-se que os cromatogramas revelavam picos para o tempo de retenção característico destes compostos. No entanto, estes picos não eram passíveis de quantificação por não se apresentarem resolvidos da matriz (Fig. 18A).

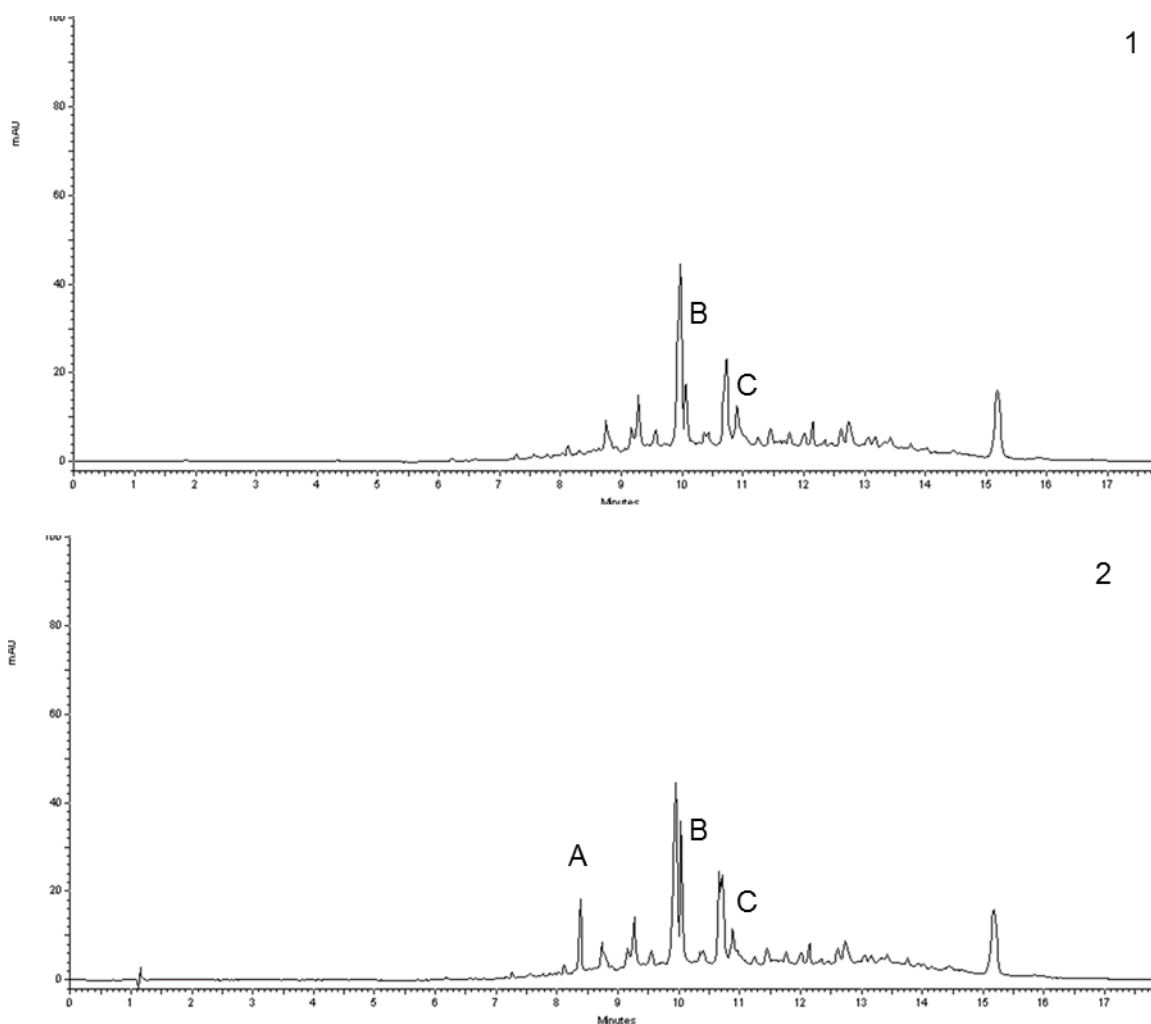


Figura 18 – 1 - Cromatograma de amostra de farinha de mamíferos, dopada com concentração de 1 mg L^{-1} antes de extração assistida por micro-ondas. Oxitetraclina (B) e tetraciclina (C). Tempo de retenção de B: 10,1 min; Tempo de retenção de C: 10,6 min. 2 - Cromatograma de amostra de farinha de mamíferos, dopada com concentração de 1 mg L^{-1} antes de extração assistida por micro-ondas, com posterior dopagem com $0,45 \text{ mg L}^{-1}$ antes da injeção em HPLC. Minociclina (A), oxitetraclina (B) e tetraciclina (C). Tempo de retenção de A: 8,4 min; Tempo de retenção de B: 10,1 min; Tempo de retenção de C: 10,7 min.

Seguidamente foi adicionada solução padrão às amostras de farinha já extraídas por microondas, antes da injeção por HPLC. Foram observados picos para os tempos de retenção caraterísticos dos compostos minociclina, oxitetraclina e tetraciclina. Para os antibióticos oxitetraclina e tetraciclina a resolução continuava a não ser suficiente para permitir a quantificação dos compostos (Fig. 18B).

A mesma quantidade de solução padrão que era aplicada antes da extração assistida por micro-ondas foi adicionada às amostras antes do processo de SPE (Fig. 19).

Na análise foram observados picos para os tempos de retenção caraterísticos dos compostos minociclina, oxitetraciclina e tetraciclina, embora para os antibióticos oxitetraciclina e tetraciclina a resolução não fosse suficiente (Fig. 19A). A adição de solução padrão às amostras, antes da injeção por HPLC, mostrou que os tempos de retenção caraterísticos dos compostos minociclina, oxitetraciclina e tetraciclina se verificavam, mas para os antibióticos oxitetraciclina e tetraciclina a resolução continuava a não ser suficiente para permitir a quantificação dos compostos (Fig. 19B).

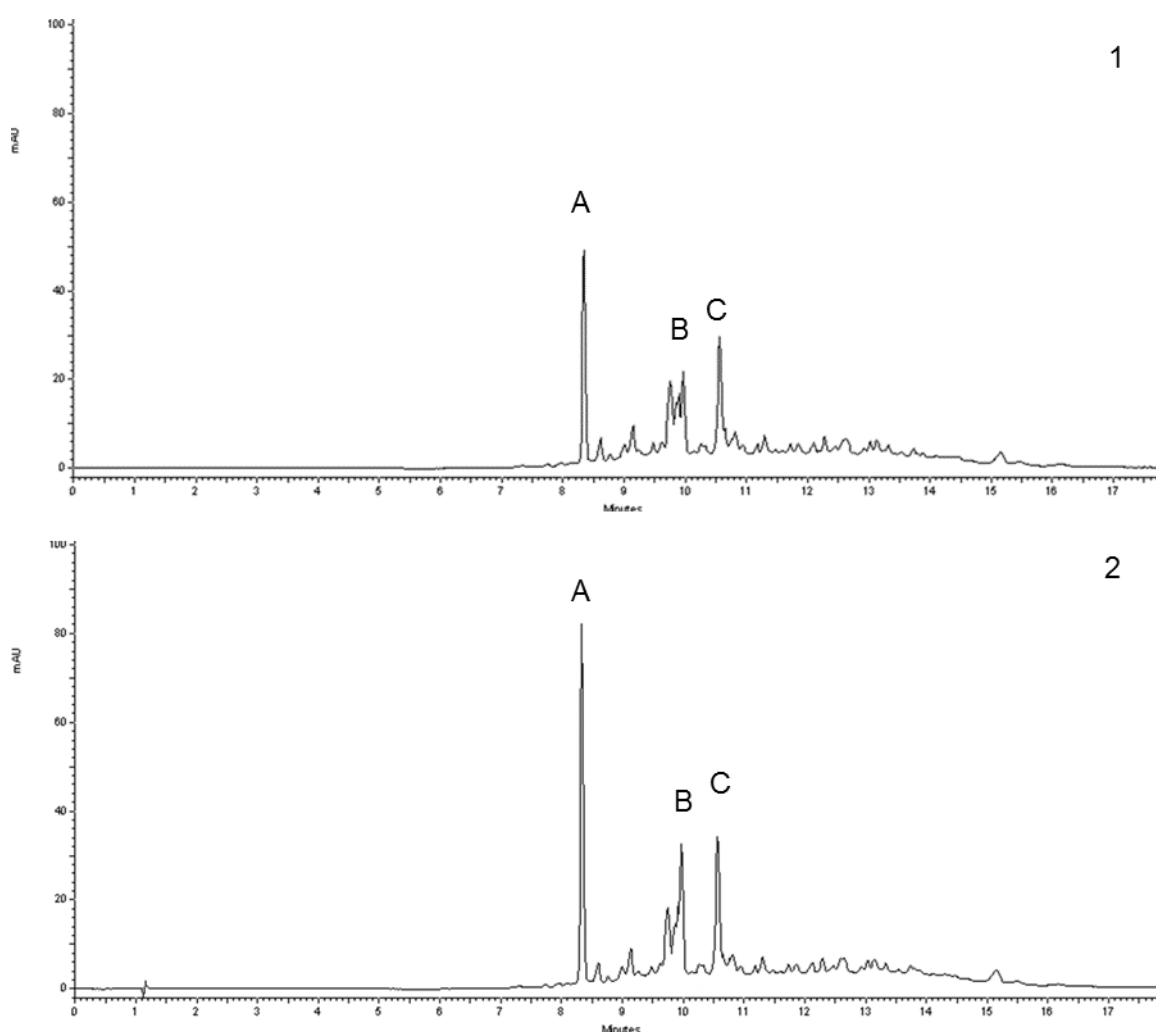


Figura 19 – 1 - Cromatograma de amostra extraída por microondas de farinha de mamíferos, dopada com concentração de 1 mg L^{-1} antes de SPE. Minociclina (A), oxitetraciclina (B) e tetraciclina (C). Tempo de retenção de A: 8,4 min; Tempo de retenção de B: 10,1 min; Tempo de retenção de C: 10,7 min. 2 - Cromatograma de amostra de farinha de mamíferos, dopada com concentração de 1 mg L^{-1} antes de SPE com posterior dopagem com $0,45 \text{ mg L}^{-1}$ antes da injeção em HPLC. Minociclina (A), oxitetraciclina (B) e tetraciclina (C). Tempo de retenção de A: 8,4 min; Tempo de retenção de B: 10,1 min; Tempo de retenção de C: 10,7 min.

Pela análise dos cromatogramas respeitantes a amostras de farinha de mamíferos, com dopagem antes da técnica de extração assistida por microondas, e fazendo uma comparação com os resultados provenientes das amostras cuja dopagem só foi efetuada após essa mesma técnica, verifica-se que as perdas da minociclina ocorrem durante o processo de extração assistida por microondas.

Em todos os casos os compostos oxitetraciclina e tetraciclina apresentaram-se sem resolução suficiente que permita a sua quantificação. O pico da minociclina, no entanto, apresentou-se bem resolvido e em condições de ser quantificado aquando da adição de padrão antes de SPE.

Recorrendo ao método da adição de padrão (efetuado em 5 amostras de farinha), obteve-se a quantificação da minociclina com uma percentagem de recuperação de massa de $86 \pm 26\%$.

Situação em tudo similar ocorreu a aquando da dopagem e farinha de penas dopadas com 1 mg L^{-1} de solução padrão antes do processo de extração assistida por microondas.

Os cromatogramas não revelaram pico para o tempo de retenção característico da minociclina, e além disso, também não foi possível quantificar os antibióticos oxitetraciclina e tetraciclina porque, apesar de serem registados picos para tempos de retenção desses compostos não eram passíveis de quantificação por não apresentarem resolução suficiente.

Adicionada a mesma quantidade de solução padrão que era aplicada antes da extração assistida por microondas às amostras de farinha de penas já extraídas em microondas e antes do processo de SPE foi possível a quantificação da minociclina com uma percentagem de recuperação de $91 \pm 13\%$ (recorrendo ao método da adição de padrão efetuado em 5 amostras de farinha).

Quando analisadas amostras de farinha de aves dopadas com 1 mg L^{-1} de solução padrão antes do processo de extração assistida por microondas, os cromatogramas ao contrário do que acontece nas restantes farinhas, revelam picos para tempos de retenção característicos da minociclina, (Fig. 20).

Os antibióticos oxitetraciclina e tetraciclina, no entanto, continuam a não apresentar resolução suficiente (Fig. 20A). Submetendo estas amostras de farinhas a dopagem com uma solução de $0,45 \text{ mg L}^{-1}$ antes da injeção no HPLC, os cromatogramas apresentaram picos para o tempo de retenção característico da dos três antibióticos (Fig. 20B).

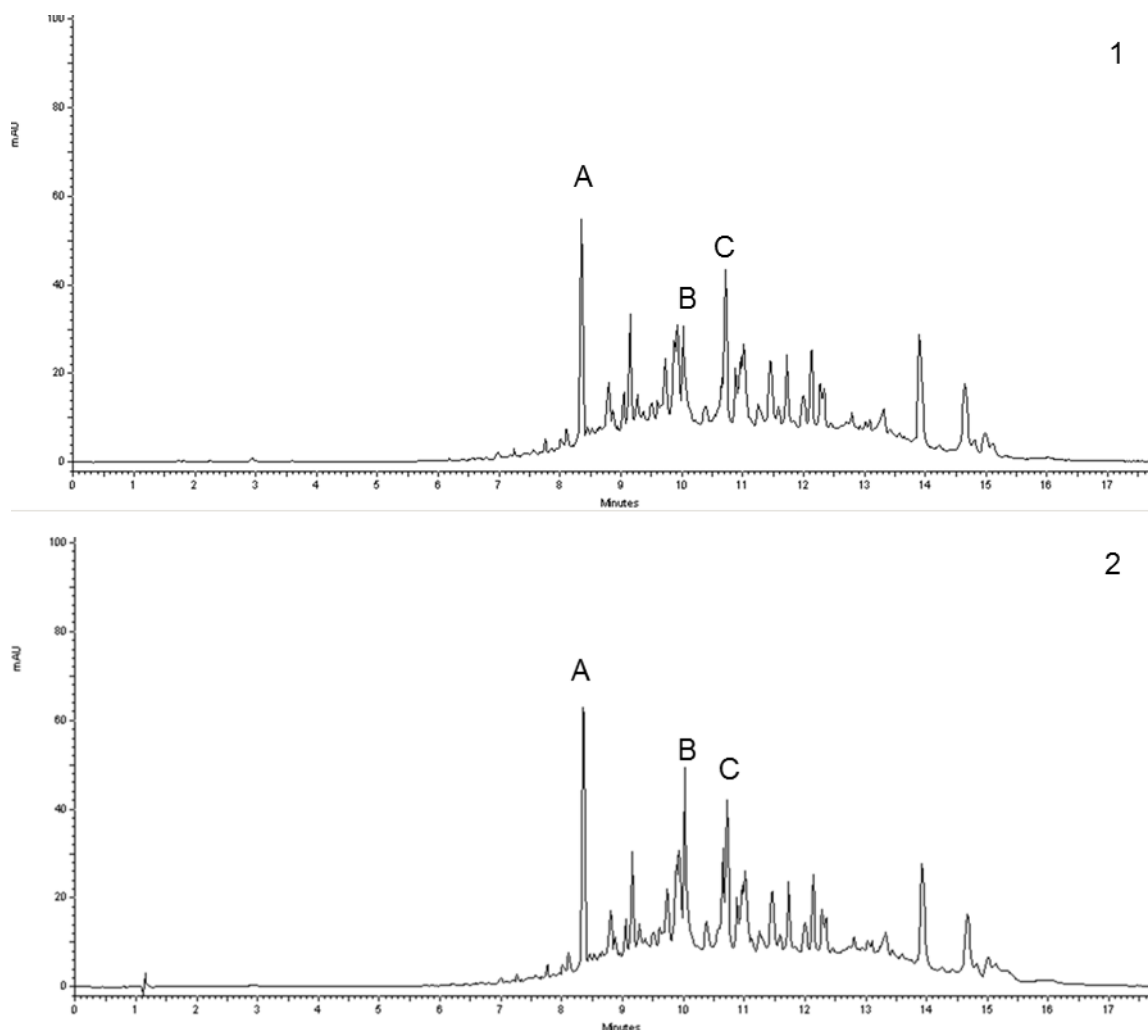


Figura 20 – 1 - Cromatograma de amostra de farinha de aves dopada com concentração de 1 mg L^{-1} antes de extração assistida por microondas. Minociclina (A), oxitetraciclina (B) e tetraciclina (C). Tempo de retenção de A: 8,4 min; Tempo de retenção de B: 10,1 min; Tempo de retenção de C: 10,7 min. 2- Cromatograma de amostra de farinha de aves dopada com concentração de 1 mg L^{-1} antes de extração assistida por microondas, com posterior dopagem com $0,45 \text{ mg L}^{-1}$ antes da injeção em HPLC. Minociclina (A), oxitetraciclina (B) e tetraciclina (C). Tempo de retenção de A: 8,4 min; Tempo de retenção de B: 10,1 min; Tempo de retenção de C: 10,7 min.

Para além disso, foi assim adicionada a mesma quantidade de solução padrão que era aplicada antes da extração assistida por microondas às amostras de farinha de aves já extraídas por microondas e antes do processo de SPE.

Quando essas mesmas amostras foram analisadas, foram observados picos nos cromatogramas para os tempos de retenção característicos dos compostos minociclina, oxitetraciclina e tetraciclina (Fig. 21A). Os compostos oxitetraciclina e tetraciclina apresentam-se sem resolução suficiente que permita a sua quantificação. O pico da minociclina apresenta-se bem resolvido e em condições de ser quantificado (Fig. 21B).

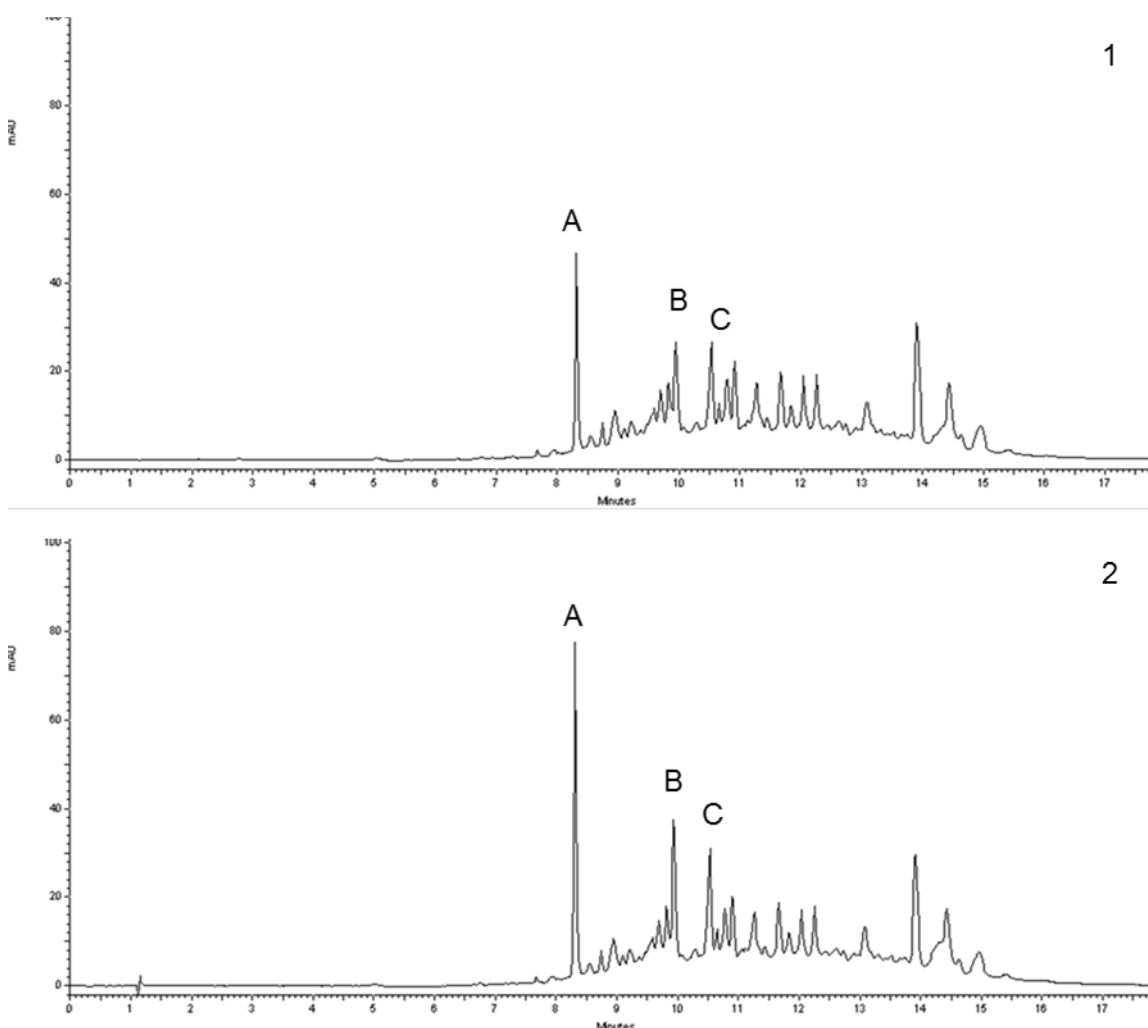


Figura 21 – 1 - Cromatograma de amostra de farinha de aves sujeita a extração assistida por microondas e dopada com concentração de 1 mg L^{-1} antes de SPE. Minociclina (A), oxitetraciclina (B) e tetraciclina (C). Tempo de retenção de A: 8,4 min; Tempo de retenção de B: 10,1 min; Tempo de retenção de C: 10,7 min. 2 - Cromatograma de amostra de farinha de aves sujeita a extração assistida por microondas e dopada com concentração de 1 mg L^{-1} antes de SPE com posterior dopagem com $0,45 \text{ mg L}^{-1}$ antes da injeção em HPLC. Minociclina (A), oxitetraciclina (B) e tetraciclina (C). Tempo de retenção de A: 8,4 min; Tempo de retenção de B: 10,1 min; Tempo de retenção de C: 10,7 min.

Recorrendo ao método da adição de padrão (efetuado em 5 amostras de farinha), consegue-se a quantificação da minociclina com uma percentagem de recuperação de $89 \pm 4\%$.

Quando são analisadas amostras de farinha de penas, dopadas com a concentração de 1 mg L^{-1} de solução padrão antes do processo de extração assistida por microondas, os cromatogramas não revelaram picos para tempos de retenção característicos da minociclina, não sendo possível a sua quantificação. (Fig. 22)

Além disso, também não foi possível quantificar os antibióticos oxitetraciclina e tetraciclina porque, apesar de serem registados picos para tempos de retenção desses compostos não são passíveis de quantificação por não apresentarem resolução suficiente.

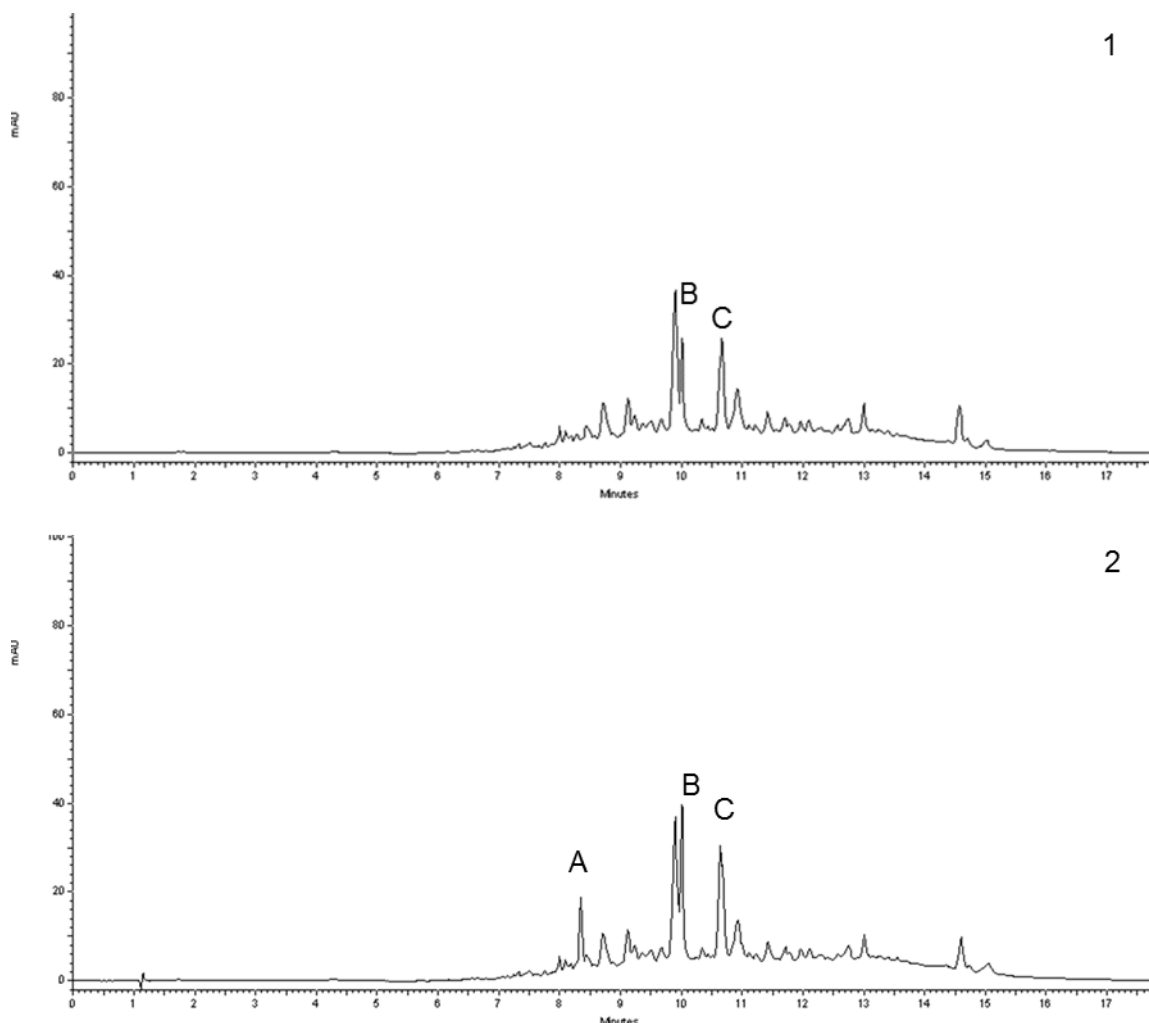


Figura 22 - 1 - Cromatograma de amostra de farinha de penas dopada com concentração de 1 mg L^{-1} antes de extração assistida por microondas. Oxitetraclina (B) e tetraciclina (C). Tempo de retenção de B: 10,1 min; Tempo de retenção de C: 10,7 min. 2- Cromatograma de amostra de farinha de penas dopada com concentração de 1 mg L^{-1} antes de extração assistida por microondas, com posterior dopagem com $0,45 \text{ mg L}^{-1}$ antes da injeção em HPLC. Minociclina (A), oxitetraclina (B) e tetraciclina (C). Tempo de retenção de A: 8,4 min; Tempo de retenção de B: 10,1 min; Tempo de retenção de C: 10,7 min.

Foi adicionada a mesma quantidade de solução padrão que era aplicada antes da extração assistida por microondas às amostras de farinha de penas já extraídas em microondas e antes do processo de SPE.

Quando essas mesmas amostras foram analisadas, foram observados picos nos cromatogramas para os tempos de retenção caraterísticos dos compostos oxitetraclina e tetraciclina. Relativamente ao composto minociclina, foi igualmente registado um pico verificado no tempo de retenção caraterístico deste composto. Pela análise dos cromatogramas respeitantes a amostras de farinhas, com dopagem antes

da técnica de extração assistida por microondas, e fazendo uma comparação com os resultados provenientes das amostras cuja dopagem só foi efetuada após essa mesma técnica, verifica-se que as perdas da minociclina se dão durante o processo de extração por microondas. (Fig. 23)

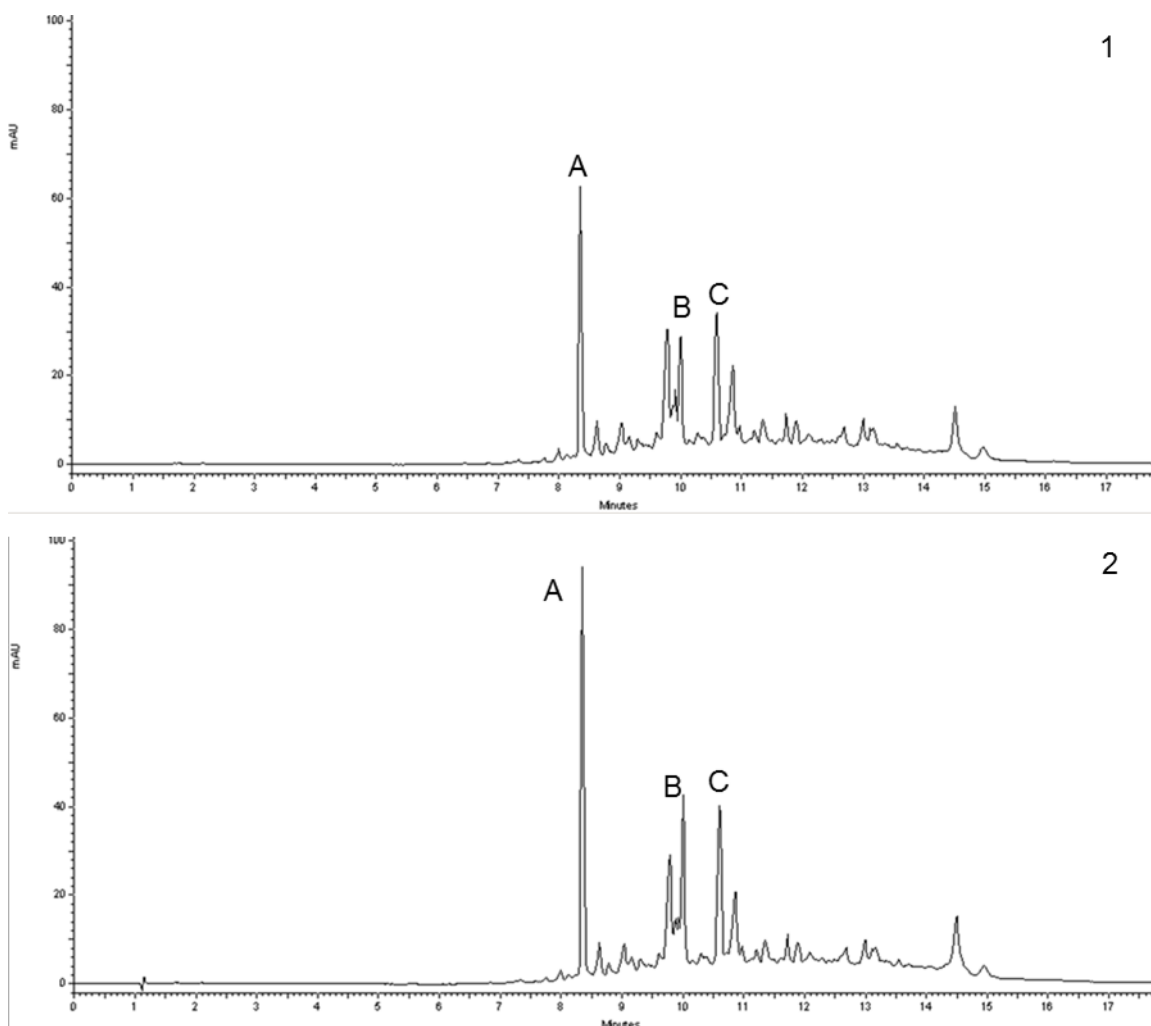


Figura 23 - 1 - Cromatograma de amostra de farinha de penas sujeita a extração assistida por microondas e dopada com concentração de 1 mg L^{-1} antes de SPE. Minociclina (A), oxitetraacyclina (B) e tetracyclina (C). Tempo de retenção de A: 8,4 min; Tempo de retenção de B: 10,1 min; Tempo de retenção de C: 10,7 min. 2 - Cromatograma de amostra de farinha de penas sujeita a extração assistida por microondas e dopada com concentração de 1 mg L^{-1} antes de SPE com posterior dopagem com $0,45 \text{ mg L}^{-1}$ antes da injeção em HPLC. Minociclina (A), oxitetraacyclina (B) e tetracyclina (C). Tempo de retenção de A: 8,4 min; Tempo de retenção de B: 10,1 min; Tempo de retenção de C: 10,7 min.

Os compostos oxitetraacyclina e tetracyclina apresentam-se sem resolução suficiente que permita a sua quantificação. O pico da minociclina apresenta-se bem resolvido e em condições de ser quantificado.

Recorrendo ao método da adição de padrão (efetuado em 5 amostras de farinha), consegue-se a quantificação da minociclina com uma percentagem de recuperação de massa de $91 \pm 13\%$ ($n=3$).

Assim, pode se concluir que a quantificação dos antibióticos da família das tetraciclinas em amostras de farinha não é possível com estas condições de processamento em microondas.

Interferências provocadas pela matriz da farinha podem estar na origem da falta de resolução dos picos, sendo necessária a adaptação do método para eliminar esses mesmos problemas e permitir a quantificação destes antibióticos.

4. Conclusão

Verificou-se que, dos métodos de limpeza e extração testados, a SPE e a secagem seriam adequados, uma vez que permitiram a posterior deteção e quantificação dos antibióticos em estudo.

A etapa da filtração terá de ser melhorada pois a taxa de recuperação dos antibióticos não se encontrava no intervalo desejado (80-120%) para os filtros estudados.

Para a família das fluoroquinolonas realizada a dopagem da farinha antes da extração assistida por microondas, seguida de SPE e secagem verificou-se que o método global permitia quantificar antibióticos nas farinhas para concentrações acima dos 5 $\mu\text{g g}^{-1}$.

Para a família das tetraciclinas, realizada a dopagem da farinha antes da extração assistida por microondas, observou-se o desaparecimento da minociclina e a impossibilidade de quantificação dos restantes compostos da família das tetraciclinas por falta de resolução nos cromatogramas, verificando-se ser necessário efetuar melhorias no procedimento para a determinação simultânea dos antibióticos na matriz da farinha.

De modo a ser possível alcançar as condições desejáveis para que o método permita determinar as concentrações dos antibióticos que poderão, eventualmente, encontrar-se nas farinhas de origem animal, será necessário, num trabalho futuro, testar diferentes condições de material e reagentes utilizados, assim como, possivelmente outras técnicas de extração e limpeza, para além das já utilizadas (extração assistida por microondas e SPE).

Os antibióticos são moléculas complexas que assumem diferente carácter atendendo ao valor de pH do meio. Assim, a variação dos solventes originando valores de pH diferentes dos utilizados seria uma abordagem a considerar, averiguando-se possíveis comportamentos dos mesmos que poderão ser úteis para melhorias da sua identificação e quantificação.

O método poderá, porventura, vir a ser mais seletivo para os compostos oxitetraciclina e tetraciclina e minociclina, optando por outras técnicas de cromatografia líquida. Como a utilização de uma coluna cromatográfica diferente.

A quantificação dos antibióticos usando deteção cromatografia líquida com espectrometria de massa poderá também contribuir para maior seletividade do método, ao eliminar interferências provocadas pela matriz da farinha em análise.

Referências Bibliográficas

- [1] Sarmah, A.K., Meyer, M.T., Boxall, A. Chemosphere 2006, 65, 725-759.
- [2] Choffnes, E. R., Relman, D. A., Olsen, L., Hutton, R., Mack, A., Improving food safety through a one health approach: workshop summary. Editor, National Academies Press, 2012.
- [3] Kolpin, D. W., Furlong, E. T., Meyer, M. T., Thurman, E. M., Zaugg, S. D., Barber, L. B., Buxton, H. T., Environmental science & technology 2002, 36, 1202-1211.
- [4] Wegener, H. C., Current opinion in microbiology 2003, 6, 439-445.
- [5] Borràs, S., Companyó, R., Granados, M., Guiteras, J., Pérez-Vendrell, A., Brufau, J., Medina, M., Bosch, J., TrAC Trends in Analytical Chemistry 2011, 30, 1042-1064.
- [6] Wang, L., Yang, H., Zhang, C., Mo, Y., Lu, X., Analytica chimica acta 2008, 619, 54-58.
- [7] Carvalho, P. N., Pirra, A., Basto, M. C. P., Almeida, C. M. R., Environmental Science and Pollution Research 2013, 20, 8790-8800.
- [8] Snowa, D., Cassadaa, D., Krapach, I., Meyerc, M., in Book Analysis of veterinary antibiotics and their degradation products in ground water using liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC/MS/MS), City, 2004, 13-15.
- [9] Kümmerer, K., Chemosphere 2009, 75, 417-434.
- [10] Barton, M. D., Nutrition research reviews 2000, 13, 279-299.
- [11] DuPont, H. L., Steele, J. H., Review of Infectious Diseases 1987, 9, 447-460.
- [12] Casewell, M., Friis, C., Marco, E., McMullin, P., Phillips, I., Journal of Antimicrobial Chemotherapy 2003, 52, 159-161.
- [13] Mellon, M., Benbrook, C., Benbrook, K. L., Estimates of antimicrobial abuse in livestock 2001, 7-9.
- [14] Kot-Wasik, A., Dębska, J., Namieśnik, J., TrAC Trends in Analytical Chemistry 2007, 26, 557-568.

- [15] Carvalho, P. N., Basto, M. C. P., Almeida, C. M. R., Brix, H., *Environmental Science and Pollution Research* 2014, 21, 11729-11763.
- [16] Cavenati, S., Carvalho, P. N., Almeida, C. M. R., Basto, M., Vasconcelos, M., *Water Science & Technology* 2012, 66.
- [17] Kumar, R. R., Lee, J. T., Cho, J. Y., *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry* 2012, 55, 701-709.
- [18] Kümmerer, K., Henninger, A., *Clin. Microbiol. Infec.*, 2003, 9, 1203–1214.
- [19] Hamer, D.H, Gill,C.J. *Nutr Rev* (2002) 60, 261-264.
- [20] CCFH. Annex to CAC/RCP-1 (1969), Rev.3 (1997), World Health Organization, Rome.
- [21] PHLS, Public Health Laboratory Service, 2003.
- [22] THE PENNINGTON GROUP, The Stationery Office, 1997.
- [23] Beechinor, J.G, *Ir Vet J*, 1993, 46,116-118 122-124.
- [24] Kloos, C.M, *Ir Vet J*, 1993, 46, 119-121.
- [25] Woodward, K.N, *General and applied toxicology*, 1999, 1633-1652.
- [26] Diggle, G., *General and applied toxicology*, 1999, 1543-1580.
- [27] REGULAMENTO (CEE) N.º 2377/90 DO CONSELHO, 1990, modificado em 2008.
- [28] Kümmerer, K., *Chemosphere*, 2009, 75, 417-434.
- [29] Mitscher, L., Devasthale, P., Zavod, R., *American Society for Microbiology*, 1993, 3-51.
- [30] Greene, C., Budsberg, S., *American Society for Microbiology*, 1993, 473-488.
- [31] National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database; CID=4539, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/4539> accessed Sept. 2, 2016
- [32] National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database; CID=2764, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/2764> accessed Sept. 2, 2016

- [33] National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database; CID=71188, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/71188> accessed Sept. 2, 2016
- [34] Chopra, I., Roberts, M., *Microbiology and molecular biology reviews* 2001, 65, 232-260.
- [35] Speer, B. S., Shoemaker, N. B., Salyers, A. A., *Clinical microbiology reviews* 1992, 5, 387-399.
- [36] E, L. L., in *Book Antibiotic-containing animal feed*, Google Patents, City, 1967.
- [37] Pijpers, A., Schoevers, E., Haagsma, N., Verheijden, J., *Journal of animal science* 1991, 69, 4512-4522.
- [38] Garrido-Mesa, N., Zarzuelo, A., Galvez, J., *British journal of pharmacology* 2013, 169, 337-352.
- [39] Eliopoulos, G. M., Roberts, M. C., *Clinical infectious diseases* 2003, 36, 462-467.
- [40] National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database; CID=54675783, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/54675783> accessed Sept. 2, 2016
- [41] National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database; CID=54675779, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/54675779> accessed Sept. 2, 2016
- [42] National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database; CID=54675776, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/54675776> accessed Sept. 2, 2016
- [43] Borràs, S., Companyó, R., Granados, M., Guiteras, J., Pérez-Vendrell, A.M., Brufau, J., Medina, M., Bosch, J., *Trends in Analytical Chemistry*, 2011, Vol.30, No. 7.
- [44] Scippo, M.L., Maghuin-Rogister, G., *Residue analysis in food: Principles and applications*, Academic Publishers, 2000, 17-36.
- [45] Barker, S.A., *Residue analysis in food: Principles and applications*, Academic Publishers, 2000, 37-71.

- [46] Winefordner, J. D., Wiley-Interscience, A John Wiley & Sons, Inc., Publication, 2003, 162.
- [47] Huie, C. W., Anal Bional Chem, 2002, 373, 23-30.
- [48] Krull, I. S., Cho, B. Y., Strong, R., Vanderlaan, M., LC-GC International, 1997, 10, 178-292.
- [49] Xiangang, H., Yi, L., Qixing, Z., Chromatographia, 2010, 71, 217-223.
- [50] Haoyan, X., Ligang, C., Lei, S., Xin, S., Xiaobo, D., Jian, W., Tianyl, W., Qinglei, Z., Hui, W., Yang, X., Xianpan, Z., Lan, D., J. Sep. Sci, 2011, 345,142-149.